

GLÁUCIO RICARDO WERNER DE CASTRO

EFEITOS DA SINVASTATINA EM MODELO DE OSTEOARTRITE EM RATOS.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina com requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

FLORIANÓPOLIS – SC

2009

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha esposa Silvania, pelo amor, pelo carinho, pela dedicação, por me proporcionar estabilidade e pela compreensão e apoio nos momentos em que tive que estar ausente. Amo você.

Aos meus pais, Helena e José Carlos, que através de muito esforço, amor e dedicação, contribuíram decisivamente para me tornar o que sou. Amo vocês.

Ao meu orientador, professor João Batista Calixto, pelo apoio e orientação na condução dos experimentos.

Aos colegas que auxiliaram em alguns dos experimentos e aos que forneceram valiosas contribuições na revisão do artigo: Cláudia, Émerson, Juliana, Rafael, Allisson e Daniela.

Aos técnicos e funcionários que forneceram suporte aos experimentos: Aline, Juliana, Patrícia e Pedro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	i
ABREVIATURAS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Articulação e cartilagem normal.....	2
1.2 Osteoartrite	6
1.2.1 Patogênese	6
1.3 Modelos de osteoartrite	11
1.4 Avaliação do tratamento	14
1.4.1 Histologia	14
1.4.2 Dor	15
1.5 Estatinas e pequenas GTPases	17
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivos gerais	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Animais	27
3.2 Procedimento Cirúrgico.....	27
3.3 Grupos	29
3.4 Avaliação da nocicepção	30
3.4.1 Teste de Incapacitância	30
3.4.2 Teste de Hipersensibilidade Tátil	31
3.4.3 Teste de Sensibilidade Térmica	32
3.4.4 Teste de campo aberto	32
3.5 Análise histológica	33
3.6 Imuno-histoquímica	34
3.7 Drogas e reagentes	36
3.8 Análise estatística	37
4. RESULTADOS	38
4.1 Testes de dor e motilidade	38

4.1.1	Teste de Incapacitância	38
4.1.2	Teste de Hipersensibilidade Tátil.....	39
4.1.3	Teste de Hipernocicepção Térmica	39
4.1.4	Teste de Campo Aberto.....	45
4.2	Análise histológica	45
4.3	Imuno-histoquímica	49
5.	DISCUSSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS.....	69
	ANEXOS	103

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Diferentes estatinas e homologia com a molécula de 3-HMGCo A.	18
Figura 2 – Via do mevalonato..	19
Figura 3 – Estrutura anatômica do joelho.....	28
Figura 4 – Procedimento cirúrgico.	29
Figura 5 – Posição do animal no Incapacitance Tester.	31
Figura 6 – Relação entre o peso distribuído nos membros posteriores direitos e esquerdos dos animais avaliados 4 semanas após o tratamento com sinvastatina ou com cetoprofeno.	400
Figura 7 - Relação entre o peso distribuído nos membros posteriores direitos e esquerdos dos animais avaliados 5 semanas após o tratamento com sinvastatina ou com cetoprofeno.	41
Figura 8 - Relação entre o peso distribuído nos membros posteriores direitos e esquerdos dos animais avaliados 6 semanas após o tratamento com sinvastatina ou com cetoprofeno.	42
Figura 9 – Frequência de resposta de retirada do membro posterior direito à estimulação com filamento de von Frey.....	43
Figura 10 - Frequência de resposta de retirada do membro posterior direito à estimulação com filamento de von Frey.....	43
Figura 11 - Tempo de latência de retirada do membro posterior direito em resposta ao estímulo térmico.....	44
Figura 12 – Número de cruzamentos de quadrantes e de levantamentos (rearings) no campo aberto.....	46
Figura 13 - Avaliação histológica da cartilagem tibial.	47
Figura 14 – Avaliação histológica da membrana sinovial.....	48
Figura 15 –Análise por imuno-histoquímica do NFkappaB p65 em cartilagem hialina..	51

Figura 16 – Análise por imuno-histoquímica do NFkappaB p65 em membrana sinovial..	52
Figura 17 - Análise por imuno-histoquímica da enzima caspase-1 em cartilagem hialina. ..	533
Figura 18 – Análise por imuno-histoquímica da enzima caspase 1 em membrana sinovial. .	544
Figura 19 - Análise por imuno-histoquímica da IL-17 na membrana sinovial.	5656

ABREVIATURAS

ADAMTS – Disintegrina-metaloproteinase com um domínio idêntico à trombospondina

AP-1 – Proteína ativadora 1

BMP – Proteína morfogênica óssea

COX - Cicloxigenase

DMSO – Dimetil sulfóxido

ERK – Quinase regulada por sinal extracelular

EDTA – Ácido etilenodiaminotetra-acético

FADD – Proteína com domínio de morte associada ao Fas

Grb2 – Proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2

GTP – Guanosina trifosfato

HMG-CoA : 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A

JNK – Quinase N-terminal C-jun

IGF-1 – Fator de crescimento insulina-like 1

IL-1 beta – Interleucina 1 beta

IL1-ra – Antagonista do receptor da interleucina 1

IL-4 – Interleucina 4

Il-6 – Interleucina 6

Il-17 – Interleucina 17

Il-18 – Interleucina 18

IkappaB – Inibidor do fator nuclear kappaB

IKAPPAB – Quinase da IkappaB

iNOS – Óxido nítrico sintase indutível

IRAK – Quinase associada ao receptor de interleucina 1

LCA – Ligamento cruzado anterior

LCM – Ligamento colateral medial

LDL – lipoproteína de baixa densidade

MAPK – Proteína quinase associada a mitógenos

MEK – MAK ou ERK quinase

MMP - Metaloproteinase

NFkappaB – Fator nuclear kappaB

NMDA – N-metil-D-aspartato

NO – Óxido nítrico

PBS – Tampão fosfato salino

PCR – Reação de polimerase em cadeia

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PIK3 – Fosfatidil-inositol 3 quinase

PPAR-gama – Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma

RIP1 – Proteína de interação com o receptor 1

TACE – Enzima conversora e TNF alfa

TAK-1 - Quinase ativada pelo TGF beta 1

TGF beta - Fator de crescimento e transformação beta

TLR-4 – Receptor Toll-like 4

TNF alfa – Fator de necrose tumoral alfa

TNFR1 – Receptor do fator de necrose tumoral alfa

TRAF – Fator associado ao receptor de TNF

RANK – Receptor ativador do NFkappaB

RANKL – Ligante do receptor ativador do NFkappaB

TRADD - Proteína com domínio da morte associada ao receptor do TNF

RESUMO

A osteoartrite é uma doença articular degenerativa, progressiva e irreversível para a qual não há, atualmente, alternativas terapêuticas eficazes. O objetivo do presente estudo foi investigar se o tratamento com sinvastatina poderia exercer efeitos sobre a evolução e os sintomas da osteoartrite. Para tanto, foi utilizado o modelo de osteoartrite em joelhos induzida por ressecção dos ligamentos cruzado anterior e colateral medial e do terço anterior do menisco medial em ratos Wistar-Hanover machos. Os animais foram divididos em grupos de acordo com a realização de cirurgia (não operados, falso-operados ou operados) e o tratamento recebido (salina, sinvastatina nas doses de 1, 10 ou 20 mg/kg/dia ou cetoprofeno 10 mg/Kg/dose). A sinvastatina foi administrada por gavagem por 45 dias, enquanto que o cetoprofeno foi administrado por via subcutânea 1 hora antes dos testes. A avaliação dos sintomas foi realizada por teste de incapacitância, teste de hipersensibilidade tátil, teste de hipernocicepção térmica e teste de campo aberto. O teste de incapacitância demonstrou que animais com osteoartrite apresentam menor apoio de peso no membro afetado pela osteoartrite quando comparados aos animais falso-operados. Os tratamentos com sinvastatina 20 mg/Kg/dia e com cetoprofeno 10mg/Kg aumentaram significativamente a proporção de peso apoiado sobre o membro operado. Não foi possível demonstrar diferenças significativas entre os animais operados e os não-operados nos testes de hipersensibilidade tátil, hipersensibilidade térmica e de campo aberto. A avaliação histológica pelo escore de OARSI demonstrou o desenvolvimento de osteoartrite no modelo utilizado e que o tratamento com sinvastatina 20 mg/kg/dia reduziu significativamente a lesão condral quando comparado aos animais operados que receberam salina. A avaliação dos cortes histológicos através de imunohistoquímica para NFkappaB p65 fosforilado, caspase 1 e IL-17 demonstrou que as articulações osteoártríticas apresentaram, em comparação com articulações não-operadas,

aumento da expressão de NFkappaB p65 e de caspase 1 na cartilagem hialina tibial, bem como de NFkappaB p65 fosforilado e IL-17 na membrana sinovial. Não foram encontrados níveis significativos de NFkappaB p65 e de IL-17 na cartilagem hialina. O tratamento com sinvastatina reduziu significativamente a expressão de caspase 1 na cartilagem hialina e de NFkappaB p65 fosforilado, caspase 1 e IL-17 na membrana sinovial. Em conjunto, os resultados do presente estudo demonstrou que sinvastatina reduz a progressão da osteoartrite e seus sintomas em um modelo experimental, sugerindo e que as estatinas podem ser úteis para o tratamento dessa doença.

ABSTRACT

Osteoarthritis is a degenerative joint disease, progressive and irreversible for which there are not effective treatments nowadays. The objective of this study was to evaluate possible effects of treatment with simvastatin in osteoarthritis' symptoms and evolution. Knee osteoarthritis was generated in Wistar-Hanover male rats by transection of the anterior cruciate and medial collateral ligaments and resection of the anterior third of the medial meniscus. The animals were divided in groups according to the surgery (nonoperated, sham operated or operated) and treatment (saline, simvastatin 1, 10 or 20 mg/kg/day or ketoprofen 10 mg/Kg/dose). Simvastatin was administered by gavage for 45 days, while ketoprofen was injected subcutaneously one hour before tests. The symptoms of osteoarthritis were evaluated by incapacitance test, tactil hypersensitivity test, thermal hypernociception test and open field test. The incapacitance test demonstrated that rats with osteoarthritis apply less weight in the affected limb. Treatment with either simvastatin 20 mg/kg/day or ketoprofen increased the weight distributed to operated limb. It was not possible to demonstrate significant differences between nonoperated and operated animals in tactile hypersensitivity, thermal hypernociception or open field tests. Histological evaluation by OARSI score confirmed osteoarthritis development in this model and demonstrated that simvastatin reduced the cartilaginous lesion when compared to saline. Expression of phospho-NFkappaB p65, caspase 1 and IL-17 was evaluated by immunohistochemistry. In osteoarthritic joints of animals that have received saline it was found increased expression of NFkappaB p65 and caspase 1, in the tibial cartilage, and of phospho-NFkappaB p65 and IL-17 in the synovial membrane. Treatment with simvastatin has reduced significantly the expression of caspase 1 in the cartilage and of phospho-NFkappaB p65, caspase 1 e IL-17 in the synovial membrane. The present study has demonstrated that simvastatin is able to reduce the progression and the

symptoms of osteoarthritis in an experimental model. Its results suggest that statins may be useful in osteoarthritis treatment.

1. INTRODUÇÃO

A osteoartrite é uma doença articular degenerativa caracterizada por lesão condral, processo inflamatório sinovial, reação do osso subcondral e formação de osteófitos. As articulações acometidas apresentam deformidades, redução de mobilidade e dor, resultando em restrição funcional (Dieppe, 1998). A osteoartrite é, na verdade, o desfecho comum de diversas condições lesivas à articulação. Embora seja estudada como uma única doença, é heterogênea quanto à etiologia, manifestações e evolução, variando de acordo com o fator causal e a articulação acometida (Cooper, 1998). É a doença osteoarticular mais comum e sua prevalência tende a aumentar com o envelhecimento da população, já que sua incidência aumenta com o envelhecimento e não é reversível (Woolf, Pfleger, 2003).

Sua exata prevalência é de difícil avaliação devido ao alto custo de exames complementares para diagnóstico de quadros iniciais, indefinições de critérios e por ser, muitas vezes, assintomática (Woolf, Pfleger, 2003; Mazzuca et al., 2003). Além disso, a prevalência varia de acordo com a população e com a articulação estudada. Sodha et al. (2005) detectaram osteoartrite da articulação trapézio-metacárpica em 94% de mulheres e 85% de homens com idade superior a oitenta anos. Eubanks et al. (2007), em um estudo realizado com 647 cadáveres, encontraram osteoartrite de articulações interfacetárias lombares em 57% dos indivíduos entre 20-29 anos, e em 100% daqueles com idade acima de 60 anos. Haara et al. (2003) relataram, após estudo que avaliou as mãos de 3.595 sujeitos, ter encontrado osteoartrite de interfalangianas distais e proximais em, respectivamente, 44% e 16% da população estudada.

Essa alta incidência gera custos expressivos para os pacientes e para os serviços de saúde. White et al. (2008) estimaram que o custo médio anual da osteoartrite por paciente nos

Estados Unidos seja de US\$ 106.145,00, enquanto que Maetzel et al. (2004) estimaram os custos médios anuais da osteoartrite no Canadá em US\$ 5700,00.

Atualmente, o tratamento da osteoartrite é baseado em: uso de medicamentos analgésicos, correção de fatores causadores de distúrbios biomecânicos da articulação e uso de um grupo de drogas referidas como “drogas de ação sintomática lenta para osteoartrite” (symptomatic slow acting drugs for osteoarthritis - sysadoa). Embora este grupo de drogas, que compreende sulfato de glucosamina, sulfato de condroitina, diacereína, extratos insaponificáveis de abacate e soja e hialurano, propicie algum efeito analgésico, é consenso que sua ação sobre a evolução da doença, se houver, é discreta (Zhang et al., 2008; Zhang et al., 2007; Zhang et al., 2005).

Assim, a osteoartrite carece, atualmente, de um tratamento eficaz que impeça sua evolução ou que seja capaz de restaurar as articulações lesadas. Além disso, não há estudos que demonstrem efeitos profiláticos de qualquer droga em pessoas predispostas a desenvolver osteoartrite.

1.1 Articulação e cartilagem normal

As articulações sinoviais ou diartrodiais são estruturas localizadas entre duas extremidades ósseas móveis, com a função de permitir determinados movimentos. São constituídas por extremidades ósseas recobertas por cartilagem hialina e limitadas pela cápsula articular, formada por tecido conjuntivo resistente. (Hasselbacher, 1998).

A cartilagem hialina é um tecido avascular e aneural que recobre os componentes ósseos de articulações diartrodiais. Permite movimentos sem atrito, absorve e dissipa as cargas que incidem sobre a articulação. Apresenta como único tipo celular os condrócitos, esparsamente dispostos no tecido, que têm função de síntese da matriz extra-celular e produção de enzimas responsáveis por sua renovação (Martel-Pelletier et al., 2008). Sua matriz é constituída

principalmente por alta concentração de proteoglicanos (agrecanos), envolta em uma densa rede de colágeno tipo II, e grande quantidade de água. Os agrecanos ligam-se de forma não-covalente a moléculas de hialurano, formando um agregado multimolecular de até 100 monômeros de agrecanos (Hardingham, Fosang, 1992). A presença de glucosaminoglicanos, como sulfato de condroitina e sulfato de queratano, atrai moléculas de água, permitindo deformação reversível quando a cartilagem é exposta a pressões (Caterson et al., 2000).

O caráter avascular da cartilagem hialina se deve, provavelmente, à composição da matriz e a fatores inibidores de angiogênese produzidos por condrócitos, incluindo a troponina-1 e a condromodulina-1. Essa característica é importante, pois a tensão de oxigênio no meio é capaz de alterar o padrão de resposta dos condrócitos a diversos estímulos (Martin et al., 2005). Por outro lado, a falta de vascularização dificulta a nutrição da cartilagem e é responsável, em parte, por seu baixo turn-over. Além disso, também dificulta a regeneração da cartilagem, já que impede o desenvolvimento de resposta inflamatória local. Consequentemente, não há limpeza da matriz, proliferação vascular ou migração de condrócitos para preencher defeitos. Assim, lesões parciais da cartilagem praticamente não regeneram. Por outro lado, lesões profundas, que atinjam o osso subcondral podem iniciar respostas vasculares e reparativas, mas o tecido produzido será fibrocartilagem e não cartilagem hialina (Goldring, Goldring, 2005).

A membrana sinovial ou sinóvia é composta por 2 a 3 camadas de células, repousando sobre tecido conjuntivo frouxo, com células adiposas e vasos sanguíneos. Não apresenta membrana basal, mas possui ampla rede de capilares fenestrados, responsáveis pela formação e reabsorção do líquido sinovial (O'Connell, 2000; Hasselbacher, 1981). É responsável pela homeostase articular, remoção de debris, produção de líquido sinovial e regulação de eventos imunológicos. Além disso, as células sinoviais produzem diversas citocinas que interferem no metabolismo da cartilagem articular (Iwanaga et al., 2000).

A homeostase da cartilagem é delicada, dependendo do equilíbrio entre fatores anabólicos e catabólicos. Os principais fatores anabólicos para a cartilagem são: fator de crescimento e transformação (TGF) beta, fator de crescimento insulina-like 1 (IGF-1) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), enquanto que os principais fatores catabólicos são: interleucina 1 (IL-1) beta e fator de necrose tumoral (TNF) alfa (Roman-Blas, et al. 2007). A importância do equilíbrio entre fatores anabólicos e catabólicos é demonstrado pelo desenvolvimento de osteoartrite em joelhos de animais knock-out para fatores associados à degradação da cartilagem, como IL1-beta, enzima conversora de IL-1 beta (caspase-1), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) ou estreptomelina (Clements et al., 2003). Por outro lado, a hiper-expressão de TGF beta pode desencadear surgimento de osteófitos (Blaney Davidson et al. 2007).

Os membros da família TGF beta exercem efeito anabólico ou reparador sobre a cartilagem, determinando aumento da expressão de proteínas da matriz celular, incluindo agreganos e colágeno. São secretados na forma de um precursor dimérico inativo depositado na matriz extracelular e ativado por clivagem proteica (Zhu, Burgess, 2001). O TGF beta age em receptores tipo I/II serina/treonina quinase, que fosforilam as proteínas regulatórias Smads 1, 2, 3, 5 e 8, as quais, conjugadas com co-smads, são translocadas para o núcleo determinado transcrição gênica (Roman-Blas, 2007). Esta via é regulada negativamente por Smads inibitórias 6 e 7 e pela ativação de Ras, a qual pode ativar MAP quinases que fosforilam Smads 2 e 3 e evitam sua entrada no núcleo (Zhu, Burgess, 2001).

O TGF beta também pode antagonizar os efeitos da IL-1 e do TNF alfa, inibindo a produção de proteases em condrócitos estimulados por IL-1, bem como a produção de metaloproteinases 9 e 13 e expressão de genes relacionados à hipertrofia de condrócitos, induzidos por TNF alfa e IL-1 (Roman-Blas et al., 2007; Chandrasekhar, Harvey, 1988).

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são membros da superfamília TGF beta que também apresentam importante papel anabólico na cartilagem articular. Da mesma forma que o TGF beta, essas proteínas são secretadas em formas inativas e exercem seus efeitos através de receptores tipo I/II serina-treonina quinase, resultando na ativação de Smads (Kaiser et al., 2004). Existem relatos que sugerem a ativação de outras vias, envolvendo as MAP quinases, incluindo ERK, JNK e p38, tanto por TGF beta quanto por BMPs (Miyazono et al., 2001).

O IGF-I estimula a síntese de proteoglicanos e promove a sobrevivência de condrócitos (Goldring et al., 2006). É produzido pelos condrócitos e age em receptores do tipo tirosina quinase, levando à ativação do eixo Grb2-Sos-Ras-Raf-ERK1/2 e de PIK3-akt (Sachdev, Yee, 2007).

A IL-1 beta é uma das citocinas que exercem efeito mais relevante sobre o metabolismo dos condrócitos. Produzida principalmente por células sinoviais e macrófagos, age em condrócitos inibindo sua proliferação, promovendo a produção de metaloproteinases e suprimindo a síntese de colágeno II e agreganos (Goldring et al., 1994; Martin et al., 2005; Gouze et al., 2001). Embora a maior parte da IL-1 beta seja produzida na sinóvia, há evidências de que os condrócitos também podem produzi-la após ativação de seus receptores toll-like 4 (TLR-4) (Bobacz et al., 2007). Após a ativação do receptor da IL-1 beta, há estimulação de uma cascata de sinalização que envolve as pequenas GTPases Rho, Rac1 e Ras; as MAP quinases p38, ERK 1/2 e JNK, e o fator de transcrição NFkappaB (Dunne, O'Neil, 2003; Geng et al., 1996).

Parte dos efeitos mediados pela IL-1 beta sobre a cartilagem ocorre por indução da expressão de cicloxigenase 2 (COX-2) e de iNOS (Mendes, 2002). A COX-2 sintetiza prostaglandina E₂, que está envolvida na degradação dos proteoglicanos da cartilagem (Hardy

et al., 2002; Thomas et al., 2002). O efeito da IL-1 beta sobre os condrócitos é mais proeminente em condições de hipóxia, situação fisiológica para a cartilagem normal (Martin, 2005 et al.; Mathy-Hartert et al., 2005).

O TNF alfa, produzido pela sinóvia, induz a síntese de diversas enzimas, entre elas, ADAMTS - 4 e 5(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs), metaloproteinases 3, 9 e 13, COX-2 e NOS. Além disso, o TNF alfa deprime a produção de componentes da matriz celular (Stevens et al., 2008; Westacott et al., 2000). O TNF alfa exerce seus efeitos, após interação com seus receptores, através de uma cascata intracelular que envolve, entre outros mediadores, pequenas GTPases, MPak quinases e os fatores de transcrição NFkappaB e AP-1 (Baud, Karin, 2001; Rockel et al., 2009).

1.2 Osteoartrite

1.2.1 Patogênese

A osteoartrite pode ser dividida em formas primária e secundária. Embora ambas compartilhem características histológicas, diferem quanto aos fatores causais e às articulações mais frequentemente acometidas. A forma secundária pode originar-se de qualquer insulto à cartilagem articular, incluindo traumas, artrites, hemartrose, meniscectomia, sobrecarga e instabilidade articular. Já a forma primária caracteriza-se pela ausência de fatores desencadeantes e pelo acometimento mais freqüente de algumas articulações: interfalangianas distais e proximais de mãos, trapézio-metacárpicas, acrômio-claviculares, quadris, joelhos, primeiras metatarso-falanginas e inter-apofisárias (Cooper, 1998).

Embora a etiologia da osteoartrite primária ainda não esteja plenamente compreendida, alguns fatores de risco têm sido descritos. Há indícios do envolvimento de

fatores genéticos, do sexo e de fatores que acarretam sobrecarga articular, como a obesidade. (Spector et al., 1996; Zhang, Jordan, 2008; Kessler et al. 2003; Hart et al., 1999; Davis et al., 1989).

Como a estabilidade articular é importante para o correto funcionamento das articulações, a influência de fatores que alteram a biomecânica articular na incidência de osteoartrite tem sido pesquisada. A hipotrofia do quadríceps secundária à osteoartrite de joelhos, fator que gera instabilidade articular, está associada a maior velocidade de progressão da lesão condral, fenômeno que pode ser amenizado por exercícios de fortalecimento desse músculo (Peterson, 2002). Além disso, lesões que geram instabilidade articular ou dano condral podem deflagrar osteoartrite secundária. Gelber et al. (2000) demonstraram, em um estudo prospectivo, que a incidência de osteoartrite de joelhos é maior em indivíduos com história de traumas em seus joelhos enquanto adolescentes ou adultos jovens.

Meniscectomias, devido à alteração da biomecânica articular, também estão associadas ao desenvolvimento de osteoartrite secundária. Song et al. (2008) demonstraram que após meniscectomia medial em ovelhas há aumento da pressão a que a porção central da cartilagem tibial está sujeita e que o local afetado persiste deformado e desidratado por longos períodos mesmo após o cessar da carga. Sturnieks et al. (2008) demonstraram, em humanos, que a meniscectomia também acarreta alterações na marcha, aumentando a adução do joelho na fase de apoio da marcha. No entanto, os estudos que demonstram maior incidência de osteoartrite pós meniscectomia em humanos devem ser encarados com certo cuidado, uma vez que fissuras meniscais podem ser manifestações precoces do processo osteoartrítico (Englund, Lohmander, 2004; Englund et al., 2003).

Embora tenham sido propostas teorias que enfatizem o papel de outras estruturas articulares, como o osso subcondral, na gênese da osteoartrite, a maior parte das evidências

aponta que essa é uma doença primária da cartilagem, que resulta em alterações sinoviais e ósseas (Ashraf, Walsh, 2008). Na osteoartrite, um desequilíbrio entre as atividades anabólica e catabólica dos condrócitos resulta em perda de cartilagem, com consequências negativas sobre a biomecânica articular. O dano condral resulta em processo inflamatório sinovial e alterações do osso subcondral, causando liberação de citocinas que interferem na função dos condrócitos. Como condrócitos adultos têm capacidade limitada de reparar a cartilagem articular, estabelece-se um ciclo vicioso que resulta em progressão contínua da osteoartrite (Cesare, Abramson, 2005).

Os condrócitos da cartilagem osteoartítica sofrem alterações fenotípicas que resultam em alteração do tipo de colágeno produzido (Aigner et al., 1999; Goldring et al., 1988), menor síntese de glucosaminoglicanos, maior síntese de enzimas que degradam a matriz condral, favorecimento da calcificação da cartilagem hialina (Kirsch et al., 1997; Johnson et al., 2008) e de sua invasão por vasos sanguíneos (Kirsch et al., 2000; Pullig et al., 2000; Smith, 2003). Além disso, o processo de degradação condral envolve apoptose de condrócitos (Kim et al. 2000; Hashimoto et al., 2004; Hashimoto et al., 1988; Thomas et al. 2007) .

A diminuição da síntese de glucosaminoglicanos e o aumento de sua degradação enzimática, fenômenos característicos da osteoartrite, causam perda de volume e da capacidade de deformação da cartilagem, resultando em menor capacidade de absorção de impactos. Embora as metaloproteinases e as collagenases também estejam presentes na cartilagem, as principais enzimas envolvidas na degradação dos agrecanos são as ADAMTS, que clivam as moléculas de agrecanos próximo ao seu ponto de ligação com a molécula de hialurano, resultando na diminuição da capacidade de retenção de líquido da cartilagem e, conseqüentemente, de sua eficácia mecânica (Caterson et al., 2000; Chockalingam et al., 2004; Tortorellas et al., 2001; Glasson et al., 2005). Já a ação das metaloproteinases na degradação da matriz condral pode ser indireta. Patwari et al. (2005) demonstraram que a

ativação da ADAMTS-4 induzida por IL-1 beta é mediada por metaloproteinase 4, que cliva a ADAMTS-4 presente em forma inativa nos tecidos.

A sinóvia também tem papel importante na osteoartrite, sendo os sinoviócitos a principal fonte de citocinas na articulação osteoartítica, entre elas IL1-beta, IL-6 e TNF alfa (Pelletier et al., 1995; Fan et al., 2007; Pelletier et al., 2001). Biópsias sinoviais realizadas em 63 portadores de osteoartrite de joelho demonstraram espessamento da camada de revestimento interna, aumento da vascularização e infiltrado inflamatório em pacientes com diversos graus de severidade de osteoartrite (Smith et al., 1997). Em alguns casos, foi também observado processo inflamatório mais intenso, com formação de panus, em pacientes com osteoartrite (Yuan, 2004 et al.; Ashraf et al., 2008; Walsh et al., 2000).

Na osteoartrite há esclerose do osso subcondral, provavelmente resultante de reação óssea à lesão condral e às citocinas. O osso subcondral esclerótico, mais rígido, poderia, teoricamente, contribuir para a lesão condral por absorver menos os impactos do que o habitual, embora os dados a esse respeito sejam controversos (Zhang et al., 2000; Hart et al., 2002). Por outro lado, existem evidências que o osso subcondral pode exercer outros efeitos sobre a cartilagem. Experimentos realizados com culturas de células mostram que osteoblastos do osso subcondral de articulações osteoartíticas podem induzir alterações fenotípicas em condrócitos. Entre esses efeitos, encontram-se a diminuição da produção de agreganos e colágeno II e o aumento da síntese de metaloproteinases 3 e 13 (Sanchez et al., 2005; Westacott et al., 1997) .

Osteófitos são proliferações ósseas características de articulações acometidas por osteoartrite. São consequência de neoformação condral e óssea, podendo surgir na junção condrossinovial ou a partir de células pluripotenciais do pericôndrio (Aigner et al., 1995). Sua formação tem sido relacionada a uma possível tentativa de regeneração da articulação. Nesse

processo, são importantes os papéis exercidos por citocinas anabólicas, particularmente por TGF beta e BMPs. O papel do TGF beta na formação de osteófitos foi demonstrado pela inoculação de adenovirus portadores de genes para TGF beta e BMP-2 em articulações. Ambas as proteínas resultaram na formação de osteófitos, embora em posições diferentes. A BMP-2 produziu osteófitos na placa de crescimento do fêmur e na patela, enquanto que o TGF beta produziu osteófitos sob os ligamentos colaterais e na patela, padrão similar à da osteoartrite induzida por collagenase e da osteoartrite de camundongos de linhagem STR/Ort. Além disso, o bloqueio da BMP-2 nestes modelos não foi capaz de inibir o surgimento dos osteófitos (Blaney Davidson et al., 2007).

O desequilíbrio entre fatores catabólicos e anabólicos da cartilagem na osteoartrite pode ser demonstrado pelo aumento da expressão de IL-1 beta e TNF alfa em articulações osteoartríticas. Além disso, foi documentada a redução dos níveis do receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) na cartilagem e aumento da expressão de receptores de IL-1 beta e de TNF alfa em condrócitos. A cartilagem hialina osteoartrítica também produz mais enzima conversora do TNF (TACE) (Fernandes et al., 2002).

Por outro lado, embora os níveis de algumas isoformas de TGF beta possam estar aumentados na cartilagem osteoartrítica (Pombo-Suarez et al., 2009), o que poderia estar relacionado a uma tentativa de reparo, a expressão de seus receptores está diminuída (Verdier et al., 2005). A esse fato somam-se os efeitos antagônicos da IL-1 beta e do TNF alfa sobre a atividade do TGF beta, contribuindo para o menor reparo tecidual (Pujol et al., 2008). Aumento dos níveis de IGF-1 e de BMPs, outras citocinas anabólicas importante para a cartilagem, também foram descritos na osteoartrite (Iwanaga et al, 2005; Doré et al., 1995; Scharstuhl et al., 2003; Blaney Davidson et al., 2006; Scharstuhl et al., 2002; van Beuningen et al., 2000). Embora o TGF beta presente na articulação osteoartrítica não seja capaz de regenerar completamente a cartilagem e resulte na formação de osteófitos (Scharstuhl et al.,

2002; van Beuningen et al., 1994), sua ação é importante para amenizar o processo. Foi demonstrado que, embora a inibição do TGF beta em modelo de osteoartrite desencadeado por papaína intra-articular previna a formação de osteófitos, prejudica o reparo da cartilagem (Scharstuhl et al., 2002).

1.3 Modelos de osteoartrite

O estudo de drogas para tratamento da osteoartrite em humanos é difícil devido à lenta evolução da doença, a dificuldades de padronização das medidas de progressão e à necessidade de procedimentos invasivos para obtenção de amostras de tecidos. Por isso, modelos animais de osteoartrite se fazem necessários para o estudo da etiopatogenia e do tratamento da osteoartrite.

Dentre os modelos atuais de osteoartrite podem ser mencionados: osteoartrite espontânea, que ocorre em algumas linhagens de animais, como os camundongos str/ORT (Gupta et al., 1993; Mason et al., 2001); modelos baseados em lesões cirúrgicas que causam instabilidade articular; modelos gerados por lesão condral direta, por papaína (Kopp et al., 1983), colagenase ou monoiodocacetato (Kalbhen, 1987); modelos gerados por manipulação cirúrgica extra-articular (miotomias, tenotomias) (Arsever, Bole, 1986); e modelos gerados por manipulação gênica, seja com o uso de animais knockout, seja através de vetores, em geral, virais (Ameye, 2006; van den Berg, 2001). Dentre as proteínas cuja manipulação pode resultar em desencadeamento de osteoartrite, citam-se o TGF beta e o colágeno II (Säämänen et al., 2000; Serra et al., 1997).

Os modelos animais de osteoartrite têm sido desenvolvidos desde a segunda metade da década de 1970. Em 1975, Erlich et al. publicaram o resultado de um modelo de secção combinada dos ligamentos cruzado anterior e colateral medial em coelhos. Em 1976, Silbermann relatou seu trabalho sobre osteoartrite induzida em articulação

temporomandibular de camundongos e, em 1977, McDevit et al. publicaram o primeiro modelo de osteoartrite em cães submetidos a secção do ligamento cruzado anterior. O modelo de osteoartrite em joelhos de ratos após a transecção do ligamento colateral medial e de meniscotomia foi descrito por Janusz et al. em 2002.

Os modelos de osteoartrite induzida por instabilidade são de particular interesse por reproduzirem o tipo de osteoartrite secundária após trauma ou cirurgia em humanos. Esses modelos podem envolver graus variados de instabilidade articular, de acordo com as estruturas lesadas no procedimento cirúrgico.

A articulação mais comumente utilizada em modelos de osteoartrite é o joelho, por seu tamanho, facilidade de acesso e dependência de mecanismos de estabilização. O joelho é a articulação entre o platô tibial, plano, e os côndilos femorais, aproximadamente cilíndricos. Esse formato permite movimentos amplos, mas torna a articulação relativamente instável. A estabilidade do joelho é aumentada por diversas estruturas: meniscos, que aumentam a congruência articular; tendões; e ligamentos colaterais, medial e lateral, e cruzados, anterior e posterior. A ação muscular, particularmente dos isquiotibiais e do quadríceps, que se insere na tibia através do tendão patelar, também é fundamental (Dilligan et al., 2005; Graham, Fairclough, 1998).

Qualquer estrutura estabilizadora do joelho pode ser lesada com intuito de produzir osteoartrite. Podem ser seccionados ou ressecados, em diferentes combinações, os ligamentos cruzado anterior e colateral medial, o menisco medial e o tendão patelar. A lesão meniscal pode ser apenas uma fissura ou a ressecção de seu terço anterior. Via de regra, quanto maior o número de estruturas lesadas, maior o grau de instabilidade obtido.

O modelo de osteoartrite ideal deve permitir o desenvolvimento de lesões semelhantes às observadas nas articulações humanas, produzir lesões em todos os animais e ser de rápida

evolução. Os modelos cirúrgicos de instabilidade articular cumprem esses pré-requisitos. A precocidade das alterações após a lesão cirúrgica foi demonstrada em diversos trabalhos. Wancket et al. (2005) demonstraram, em modelo de artrose induzida por meniscotomia medial, que, após a meniscotomia, a perda de glucosaminoglicanos inicia-se já no terceiro dia. Appleton et al. (2007), utilizando modelo de ressecção do ligamento cruzado anterior e meniscectomia medial parcial, demonstraram que as alterações histológicas iniciam-se tão cedo quanto duas semanas após a cirurgia. Lorenz et al. (2005), utilizando modelos de osteoartrite por ressecção do LCA em cães, detectaram aumento precoce da produção de colágeno II e I. Essas alterações permaneceram estáveis até o final do estudo, com 48 semanas. O aumento da expressão de MMP-13, neste modelo, ocorreu somente após 24 semanas.

Hayami et al. (2006) utilizaram diversas combinações de lesões cirúrgicas em joelhos de ratos: cirurgia sham, ressecção isolada do ligamento cruzado anterior e ressecção combinada dos ligamentos cruzado anterior e colateral medial associada a meniscectomia medial parcial. Observaram que as alterações condrais iniciam-se 2 semanas após a cirurgia e que, por volta desse período, há reabsorção do osso subcondral, seguido por posterior aumento de seu volume. Demonstraram ainda, que quanto maior o grau de instabilidade articular, maior e mais precoce o dano articular. O surgimento de osteófitos no último modelo iniciou por volta de 6 semanas.

No tocante à localização do dano condral, tem sido demonstrado, que modelos baseados em lesões das estruturas medial da articulação (menisco ou ligamento colateral medial), apresentam lesões mais precoces no compartimento femuro-tibial medial (Mapp et al., 2008). Também foi demonstrado que a cartilagem tibial sofre lesões mais precocemente do que a femoral (Wancket et al., 2005).

Modelos cirúrgicos de osteoartrite permitem, ainda, variar a velocidade de evolução da lesão articular de acordo com o grau de instabilidade articular, conforme demonstrado por Kakemura et al. (2005) e Hayami et al. (2006). A possibilidade de obtenção de modelos menos severos é importante porque modelos muito severos podem ser de tratamento muito difícil, prejudicando a avaliação da eficácia dos tratamentos.

1.4 Avaliação do tratamento

A avaliação da osteoartrite deve compreender as alterações histológicas próprias da doença, a expressão das principais citocinas envolvidas em sua gênese e seus sintomas cardinais: dor e limitação funcional.

1.4.1 Histologia

A histologia permite identificar diferentes estágios da evolução da osteoartrite em todos os tecidos envolvidos. Os sistemas de graduação mais antigos, como o desenvolvido por Makin et al. (1981), não levam em consideração a extensão do dano articular e foram baseados em espécimes com osteoartrite avançada, o que não os torna adequados para avaliação de estágios iniciais da doença (Pritzker et al., 2006).

O sistema proposto pela Osteoarthritis Research Society International (OARSI), baseado em análises histológicas de diversos estágios da progressão típica da osteoartrite, analisa a severidade da lesão, representada pela profundidade da lesão condral, e sua extensão. A severidade da lesão é medida em graus e sua extensão, em estágios. O resultado final provém da multiplicação dos dois dados (Pritzker et al., 2006) (ver anexo 1). Para análise histológica de cartilagem, é necessário empregar colorações que coram proteoglicanos, como safranina O ou azul de toluidina, o que permite análise do seu grau de depleção.

A cartilagem normal é organizada em três zonas: superficial, média e profunda. A superfície da cartilagem normal é lisa e não há sinais de proliferação de condrócitos. Nas fases iniciais da osteoartrite, há edema da matriz, que pode dar a impressão de hipertrofia da cartilagem. Nessas fases pode haver proliferação, hipertrofia e apoptose de condrócitos na zona superficial. Com a evolução do processo degenerativo, há perda de proteoglicanos da matriz extracelular, resultando em diminuição de coloração (Pritzker et al., 2006).

O avanço da lesão gera perda de substância da cartilagem que se inicia por abrasão superficial e progride com desenvolvimento de fibrilação, formação de fissuras cada vez mais profundas, chegando à perda de fragmentos e, por fim, à desnudação do osso subcondral. Posteriormente, sobre o osso exposto, pode haver formação de reparo de fibrocartilagem. O osso subcondral desnudo apresenta-se mais espesso do que o habitual, embora menos mineralizado, o que pode dar origem a microfraturas, que também sofrerão reparo por fibrocartilagem (Pritzker et al., 2006).

As alterações celulares acompanham a profundidade da solução de continuidade da cartilagem. Com a evolução do processo osteoartítico, as alterações reativas e a perda de condrócitos inicialmente confinadas à zona superficial, passam a ser notadas na zona média e, por fim, na zona profunda (Pritzker et al., 2006).

1.4.2 Dor

A avaliação da dor é fundamental em estudos de osteoartrite já que este constitui, ao lado do déficit funcional e da deformidade, a tríade de sintomas cardinais da osteoartrite.

A intensidade da dor não está diretamente correlacionada, em humanos, ao grau de lesão condral. Isso pode ser justificado pelo fato de a cartilagem, o principal sítio de lesão, não ser inervada. Portanto, outras estruturas como membrana sinovial, bursas, ligamentos e osso subcondral, são responsáveis pela sensação de dor. Mecanismos centrais também podem

estar relacionados à parte da sensação dolorosa (Dieppe, 1998). Torres et al. (2006) procuraram correlacionar achados à ressonância nuclear magnética com o quadro doloroso de pacientes com osteoartrite de joelhos. Em uma população de 143 indivíduos com osteoartrite primária de joelho, os fatores mais associados à severidade da dor foram: atrito ósseo sub-articular, edema da medula óssea, sinovite/efusão articular e lesões meniscais.

Embora a dor da osteoartrite esteja localizada principalmente na articulação acometida, em modelos experimentais de osteoartrite de joelhos é difícil medir a sensibilidade dolorosa diretamente no local. Têm sido utilizados, então, testes de hiperalgesia à distância no mesmo membro, entre eles, testes de hiperalgesia tátil, térmica e mecânica.

A quantidade de peso apoiada no membro afetado permite aferição indireta da dor em um joelho acometido por osteoartrite. Como a dor da osteoartrite apresenta caráter mecânico, ou seja, piora com o uso da articulação, é esperado que o joelho afetado seja relativamente poupado na distribuição de peso. O gradiente entre a distribuição de peso nas patas inferiores, medido pelo teste de incapacitância, permite a avaliação de desconforto articular que se assemelha à osteoartrite de membros inferiores em humanos (Bove et al., 2003).

Apesar de ter sido estabelecido que os diferentes modelos de osteoartrite efetivamente causam dor, os resultados de diversos estudos são bastante variáveis. Tais variações podem decorrer de diferentes técnicas utilizadas, da análise dos resultados dos testes empregados, do grau de estresse dos animais ou de fatores genéticos. Foi demonstrado que diferentes linhagens de animais podem apresentar limiares de dor distintos e comportar-se de modo desigual nos testes de dor (Vendruscolo et al., 2004).

Fernihglough et al. (2004) compararam dois modelos de osteoartrite em ratos Wistar, por meniscectomia medial parcial e por monoiodoacetato, utilizando testes de incapacitância, de hiperalgesia mecânica (Randall-Sellito) e alodinia tátil com filamentos de Von Frey.

Desse modo, os autores observaram que o modelo de osteoartrite induzida por monoiodoacetato produz respostas dolorosas mais consistentes. De fato, o modelo de meniscectomia não foi capaz de produzir resultados significativamente diferentes dos controles para os testes de incapacitância e de hiperalgesia mecânica. Foi demonstrada alodinia tátil em ambos os grupos, mas o grupo que recebeu monoiodoacetato apresentou alterações mais precoces. Ainda em relação ao modelo de osteoartrite por monoiodoacetato, Vosnyet al. (2008), utilizando ratos Sprague-Dawley, determinaram a presença de alodinia tátil (Von Frey) e ao frio (acetona), além de alterações da função motora (rotarod). Já, Combe et al. (2004) demonstraram alterações nos testes de alodinia tátil (von Frey) e de incapacitância. Quanto aos modelos de instabilidade articular, Bove et al. (2006), utilizando modelo de transecção de ligamento colateral medial e menisco medial em ratos Lewis, encontraram alterações precoces na distribuição de peso entre as patas posteriores e alodinia tátil. No entanto, não encontraram alteração nos testes de hiperalgesia térmica ou mecânica (Randall-Sellito).

1.5 Estatinas e pequenas GTPases

As estatinas são drogas largamente empregadas no tratamento de hipercolesterolemia. Os diversos fármacos desse grupo, entre eles, mevastatina, lovastatina, sinvastatina, pravastatina e rosuvastatina, possuem um esqueleto semelhante à 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG), apresentando alta afinidade pela 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, (Figura 1).

A HMG-CoA redutase é fundamental para a síntese de mevalonato, sendo um passo limitante na síntese do colesterol. Ao bloquear esta via, as estatinas inibem a síntese do colesterol e dos metabólitos intermediários geranilpirofosfato e farnesilpirofosfato, essenciais

na prenilação de pequenas GTPases, modificação fundamental para sua localização na membrana celular e para sua função (Shitara, Sugiyama, 2006), (Figura 2).

As diversas estatinas diferem por seu caráter hidro ou lipofílico e pelo processo de metabolização. A sinvastatina é uma prodroga lactona que sofre metabolização reversível para sua forma hidróxi ácida ativa (Shitara, Sugiyama, 2006). É bem absorvida por via oral, mas tem altas taxas de depuração hepática, de sorte que, após a ingestão oral, apenas 5-8% atingem a circulação sistêmica de forma inalterada (Vickers et al., 1990). Essa baixa biodisponibilidade se deve à alta afinidade pela enzima CYP3A4 do citocromo P450 e pela glicoproteína P, muito expressos no fígado e no intestino. Seu caráter lipofílico faz com que a sinvastatina seja distribuída pelos tecidos de forma inespecífica. Após ingestão oral, seu pico de concentração tecidual ocorre entre 0,5 - 2 horas, concentrando-se preferencialmente no fígado, principal responsável por sua depuração (Germershausen et al., 1989; Shitara, Sugiyama, 2006).

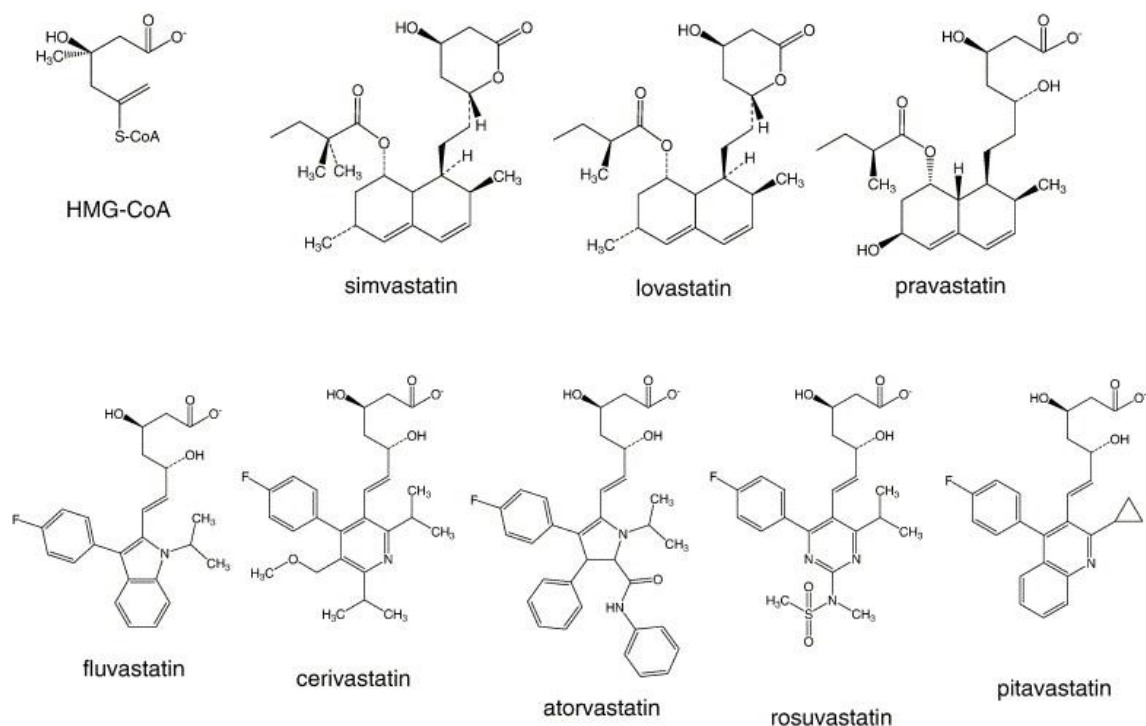


Figura 1 – Diferentes estatinas e homologia com a molécula de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A. Adaptado de Shitara e Sugiyama (2006).

Utilizadas inicialmente por seus efeitos hipolipemiantes, as estatinas têm, na verdade, ação pleiotrópica, destacando-se seus efeitos anti-inflamatórios e sobre o metabolismo ósseo. Os efeitos anti-inflamatórios das estatinas, percebidos após a constatação de que essas drogas eram capazes de reduzir a aterosclerose por mecanismos que não se limitavam à redução das taxas de LDL (Sukhova et al., 2002; Sparrow et al., 2001), se devem à interferência na função de pequenas GTPases, enzimas envolvidas em diversos processos intracelulares (Itoh et al., 2007; Li et al., 2008; Chen et al., 2000; Yamamoto, 2003) Yano et al. (2007) demonstraram que a sinvastatina suprime a translocação para a membrana celular de Ras, RhoA, Rac, and Cdc42.

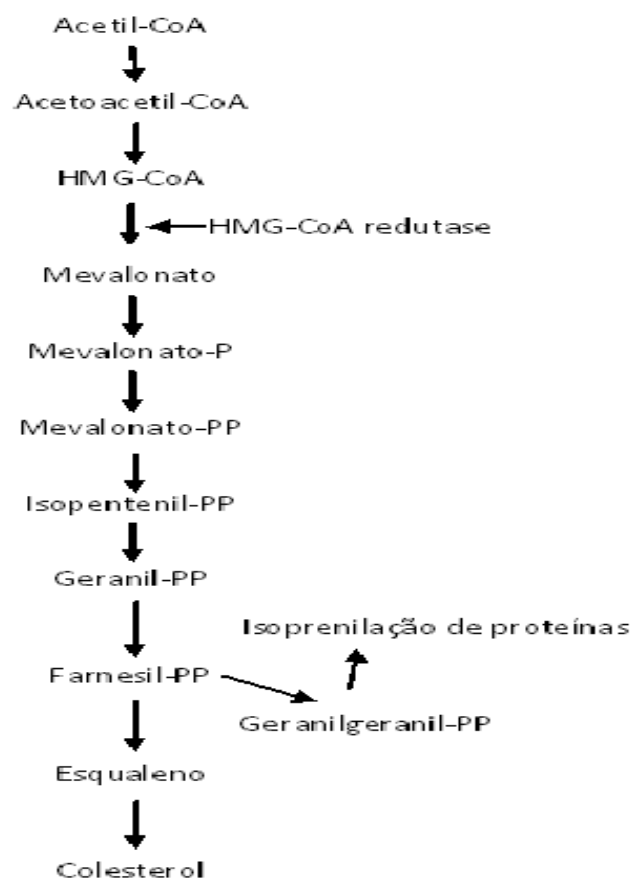


Figura 2 – Via do mevalonato. Adaptado de Shitara e Sugiyama. (2006).

As pequenas GTPases compreendem mais de 100 proteínas, divididas em cinco superfamílias: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf e RAn. As moléculas da família Ras regulam a expressão gênica; as da família Rho, a organização do citoesqueleto e a expressão gênica; Rab e Sar1/Arf, são importantes no tráfico de vesículas; e Ran regula o transporte nucleocitoplasmático e a organização de microtúbulos. São proteínas monoméricas, inativas quando ligadas a guanosinadifosfato (GDP) e ativas quando ligadas a guanosina trifosfato (GTP). Em geral, tanto a dissociação do GTP, quando a atividade de GTPase dessas enzimas são muito lentas. A dissociação de GDP e subsequente ligação de GTP é facilitada por proteínas trocadoras de nucleotídeo de guanina (GEPs). Por outro lado, a lise do GTP é facilitada por proteínas ativadoras de GTPase (GAP). Algumas pequenas GTPases, como as Rho, podem ser reguladas por inibidores da dissociação de nucleotídeo de guanina (GDI) (Takai et al., 2001, Wennerberg, Derk, 2004).

As pequenas GTPases das famílias Ras e Rho fazem parte das vias de sinalização intracelular de diversos receptores. Esses receptores, em geral com atividade de tirosina quinase, intrínseca ou associada, ativam as GEPs que, por sua vez, ativam as pequenas GTPases. Existem, ainda, evidências de que alguns receptores ligados a proteínas G podem ativar diretamente pequenas GTPases. A função de regulação da expressão gênica dessas proteínas depende da ativação de efetores, em geral da via MEK-MAP quinases, que, por sua vez, ativarão fatores de transcrição nuclear. A organização do citoesqueleto e a motilidade celular envolve a ativação de outros efetores, como as ROCKs, que fosforilam proteínas responsáveis pela organização das moléculas de actina e pelo controle da contratilidade da actina-miosina. (Takai et al. 2001, Bhattacharya et al., 2004)

As proteínas Ras, Rho e Rab sofrem modificações pós-translacionais com lipídeos e proteólise que lhes permitem ancorar-se à membrana citoplasmática onde podem interagir com efetores das cascatas de sinalização intracelular (Takai et al., 2001; Wennerberg, Derk, 2004). Dois produtos da via do mevalonato, geranilpirofosfato e farnesilpirofosfato, são importantes para as modificações pós-translacionais de pequenas GTPases das famílias Ras e RhoA (Waiczies et al., 2007). A demonstração de que a alteração da função das pequenas GTPases pelas estatinas decorre da prenilação deficiente foi obtida pela observação de redução de diversos de seus efeitos pela reposição de geranilpirofosfato ou de farnesilpirofosfato, mas não de colesterol (Lazzerini et al., 2004; Maher et al., 2009).

Dessa forma, é possível que as estatinas apresentem efeitos sobre a evolução da osteoartrite, tendo em vista suas ações sobre processos inflamatórios, metabolismo ósseo e angiogênese e o papel de pequenas GTPases nas vias de sinalização intracelulares das citocinas mais importantes para o metabolismo dos condrócitos.

Em geral, o papel das pequenas GTPases no metabolismo de condrócitos tem sido pouco estudado. Demonstrou-se que a ativação de RhoA suprime a diferenciação de condrócitos em direção à hipertrofia (Wang et al., 2004). Por outro lado, Rac1 e Cdc42 podem ter efeitos opostos à RhoA no desenvolvimento da hipertrofia de condrócitos, além de desencadear sua apoptose. Ambos os processos são mediados, ao menos em parte, pela p38 (Wang et al., 2005).

Os dados sobre o papel das pequenas GTPases na osteoartrite são escassos. Gebherd et al. (2004), utilizando condrócitos de coelhos, demonstraram que RHO β é expressa em condrócitos normais, mas que sua expressão é diminuída em condrócitos osteoartríticos. Foi demonstrado ainda, que a ativação de sinoviócitos por cristais de cálcio ocorre através da ativação de Ras e MAPK e resulta na ativação de c-fos (Major et al., 2007).

Outros dados que permitem prever algum efeito das estatinas sobre a osteoartrite derivam da participação das pequenas GTPases nas cascatas intracelulares das principais citocinas envolvidas em sua gênese. Em condrócitos, a IL-1 beta causa ativação de RhoA, enquanto que a IGF-1 tem efeitos contrários (Novakofski et al., 2009). Além disso, a alteração da resposta de condrócitos a estresses osmóticos provocada pela IL-1 beta pode ser revertida por inibição de Rho (Pritchard et al., 2008). Em culturas de condrócitos, a sinvastatina reduz a produção de MMP-3 em resposta a IL-1 beta (Lazzerini et al., 2004). Dombrecht et al. (2007) demonstraram que sinvastatina pode reduzir a produção de IL-6, IL-8 e NO em resposta ao estímulo de condrócitos em cultura com uma mistura de IL-1 beta e TNF alfa.

No único estudo publicado até o presente sobre os efeitos das estatinas em um modelo de osteoartrite, Akasaki et al. (2009) demonstraram que a mevastatina exerce seus efeitos particularmente sobre a sinóvia. Utilizando cultura de sinoviócitos, os autores observaram que essa estatina inibe a produção de metaloproteinases em resposta à IL1 beta, mas tal resultado não foi reproduzido em cultura de condrócitos. Além disso, quando administrada semanalmente, por via intra-articular, em joelhos de coelhos nos quais a osteoartrite foi induzida por ressecção do ligamento cruzado anterior, a mevastatina foi capaz de diminuir os escores de inflamação sinovial, o número de células CD 68+, a expressão do RNA de IL-1 beta, MMP3 e MMP13 na sinóvia e o grau de lesão condral.

Os efeitos anti-inflamatórios das estatinas foram demonstrados em diversos modelos e doenças. Sparow et al. (2001) demonstraram que a administração de sinvastatina por via oral produz efeito semelhante ao observado pela administração de indometacina na redução do edema de pata induzida pela carragenina em camundongos. Leung et al. (2003) conseguiram inibir, com administração de sinvastatina, o desenvolvimento e a atividade clínica da artrite induzida por colágeno em camundongos. Shirinsky et al. (2009), após tratarem portadores de

artrite reumatóide com sinvastatina 40 mg/dia por 3 meses, constataram redução dos níveis de IL-17 e da proliferação espontânea de linfócitos mononucleares do sangue periférico.

Na artrite reumatóide, em particular, a ação das estatinas sobre sinoviócitos está bem documentada. Segundo Xu et al. (2006), a sinvastatina inibe a ativação de RhoA e NFkappaB e a produção de IL-1 e IL-6 induzidas por TNF alfa em sinoviócitos de pacientes com artrite reumatóide. Por sua vez, Yokota et al. (2008) demonstraram que a ação da sinvastatina sobre cultura de sinoviócitos fibroblastos-like de pacientes com artrite reumatóide pode inibir sua proliferação e a produção de IL-6 e IL-8 em concentrações de 0,05 – 0,1 μ M. Já concentrações maiores de sinvastatina, entre 1 e 50 μ M, induzem apoptose nessas células. Os efeitos da sinvastatina em cultura de sinoviócitos podem ser revertidos com a adição de mevalonato ou de geranilgeranilpirofosfato, mas não de farnesilpirofosfato (Lazzerini et al., 2007; Yokota et al., 2006).

Efeitos das estatinas também foram demonstrados em diversos outros tipos celulares, sempre associados à inibição de Rho. Em células epiteliais, a sinvastatina inibe a produção de colágeno 1 induzida por TGF (Itoh et al., 2007). Em miofibroblastos cardíacos, a sinvastatina inibe o fenótipo invasivo e a secreção de MMP-9 induzidos por TNF alfa (Turner et al., 2007). Em células de músculo liso vascular, a sinvastatina inibe a secreção de metaloproteinases desencadeada por PDGF e IL-1, sem, no entanto, haver inibição das principais vias envolvidas: ERK, p38 e NFkappaB (Turner et al., 2005; Li et al., 2008). Ainda nesse tecido, a fluvastatina e a cerivastatina aumentaram a produção de NO (Chen et al., 2000; Yamamoto et al., 2003). Também foi demonstrado que a cerivastatina pode inibir a proliferação e a migração de células endoteliais, fenômenos dependentes da inibição de RhoA (Vincent et al., 2002; Park et al., 2002), e a produção de MMP-2, através da inibição da Ras (Vincent et al., 2001).

As estatinas podem reduzir, de modo dependente da dose, a migração de neutrófilos, fenômeno dependente de Rho (Maher et al., 2009). Em coelhos submetidos à lesão da artéria femoral e dieta aterogênica, foi demonstrado que a sinvastatina reduziu, em lesões ateroscleróticas, a ativação de NFkappaB, a infiltração e macrófagos e a expressão de IL-8 e MMP-3 (Hernández-Presa et al., 2003). No tocante aos efeitos ósseos, a sinvastatina inibe a osteoclastogênese induzida por RANKL e pode reduzir a perda de massa óssea na osteoporose (Ahn et al., 2008; Hughes et al., 2007; Uzzan et al., 2007).

Além disso, as estatinas podem inibir a expressão de moléculas de classe II do MHC induzida por interferon gama em culturas de diversos tipos celulares, embora não afete células em que essas moléculas são expressas constitucionalmente ou a expressão de moléculas de MHC de classe I (Kwak et al., 2000). Foi demonstrado, ainda, que as estatinas são capazes de ativar os fatores de transcrição PPAR alfa e gama, em mecanismo mediado por RhoA (Martin et al., 2001; Desjardins et al., 2008; Yano et al., 2007). A ativação do PPAR alfa por sinvastatina pode ter papel na inibição da migração de neutrófilos induzida por lipopolissacarídeo e por carragenina em camundongos C57BL6 (Martin et al., 2001; Paumelle et al., 2006). No entanto, em alguns casos, a administração de estatinas pode ter efeito pró-inflamatório. Kuijk et al. (2008) e Mandey et al. (2006) demonstram que a sinvastatina pode provocar liberação de IL-1 em células mononucleares por ativação de Rac1, resultando em níveis aumentados de caspase 1.

A despeito da mialgia experimentada por alguns pacientes em uso de estatinas, em camundongos, foi demonstrado um possível efeito analgésico em modelo de hipernocicepção mecânica causada por injeção de lipopolissacarídeos, bradicinina, IL-1 beta, KC e PGE₂. No entanto, é provável que esse efeito se deva à ação anti-inflamatória das estatinas (Santodomingo-Garzón et al., 2006).

Tendo em vista a necessidade de tratamentos que possam efetivamente prevenir ou, ao menos, controlar a evolução da osteoartrite e os efeitos das estatinas sobre vias de sinalização intracelular de citocinas importantes em sua gênese, o presente estudo foi conduzido para investigar se a sinvastatina poderia afetar a evolução da osteoartrite.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos do tratamento prolongado com a sinvastatina sobre o desenvolvimento e os sintomas da osteoartrite induzida por ressecção ligamentar e meniscectomia medial parcial em joelhos de ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Padronizar o modelo de osteoartrite em joelhos de ratos através de ressecção de ligamentos cruzado anterior e colateral medial associada à meniscectomia medial parcial.
- 2-Avaliar o efeito da sinvastatina na evolução da osteoartrite pela comparação dos achados histológicos em animais tratados e não tratados.
- 3- Avaliar os efeitos da sinvastatina sobre o quadro algico associado à osteoartrite.
- 4- Determinar, através da técnica de imuno-histoquímica, alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na ação da sinvastatina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar-Hanover machos, com peso aproximado de 200 g, criados no Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX), Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura (22 ± 2 °C) e umidade (60 – 80 %) controladas, sob ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e comida ad libitum em gaiolas com ar filtrado e ração esterilizada..

Os animais foram manejados de acordo com o preconizado no guia para cuidados e uso de animais de laboratório (NIH 85-23). O protocolo de pesquisa foi aprovado pela comissão de ética em uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA) – parecer 23080.051568/2008-15.

3.2 Procedimento Cirúrgico

Para indução de osteoartrite, os animais foram submetidos à ressecção dos ligamentos cruzado anterior e colateral medial e do terço anterior do menisco medial do joelho direito, de acordo com a técnica descrita por Hayami et al. (2003), com algumas modificações. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em câmara de fluxo laminar. Após anestesia com quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (5 mg/Kg), por via intraperitoneal, foram incisadas, com uso de bisturi, a pele e a fáscia. A seguir, a cápsula articular foi incisada no sentido longitudinal, medialmente ao tendão patelar. Com uso de microtesouras, o ligamento colateral medial foi exposto e seccionado. Procedeu-se, então, a exposição do menisco medial e cuidadosa ressecção dos ligamentos entre este e a tíbia e o fêmur. Seguro por pinça

hemostática, o terço anterior do menisco medial foi ressecado. Por fim, o ligamento cruzado anterior foi ressecado, a articulação foi lavada com soro fisiológico 0,9% e a seguir foi procedida sutura da cápsula articular e da pele com fio de seda 4.0. (figuras 3 e 4)

Os animais submetidos à cirurgia sham (falso operado) sofreram procedimento idêntico ao descrito anteriormente, até a incisão da cápsula articular. Nesse ponto, a articulação foi lavada com soro fisiológico e foi procedida sutura da cápsula articular e da pele com fio de seda 4.0. Após o procedimento cirúrgico foi permitido aos animais deambular livremente na gaiola.

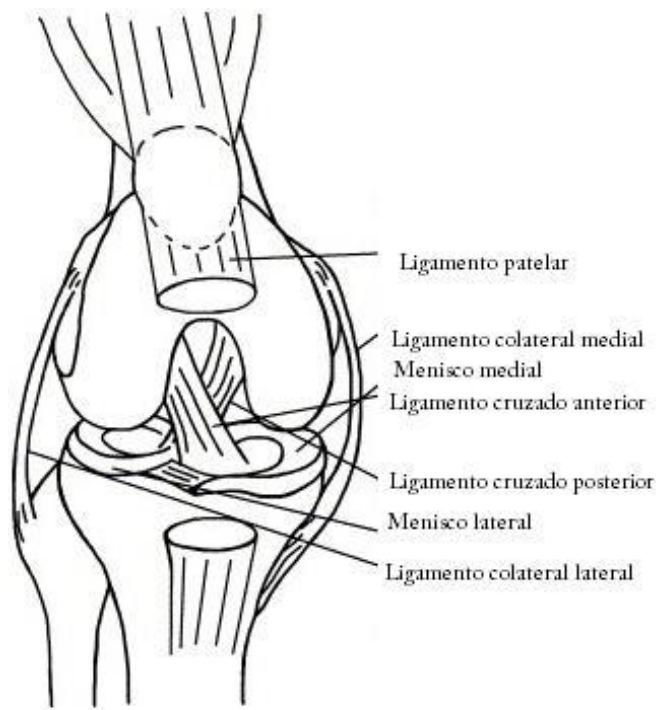


Figura 3 – Estrutura anatômica do joelho. Articulação representada em flexão e com secção do tendão patelar. Adaptado de Kamekura et al. (2005).

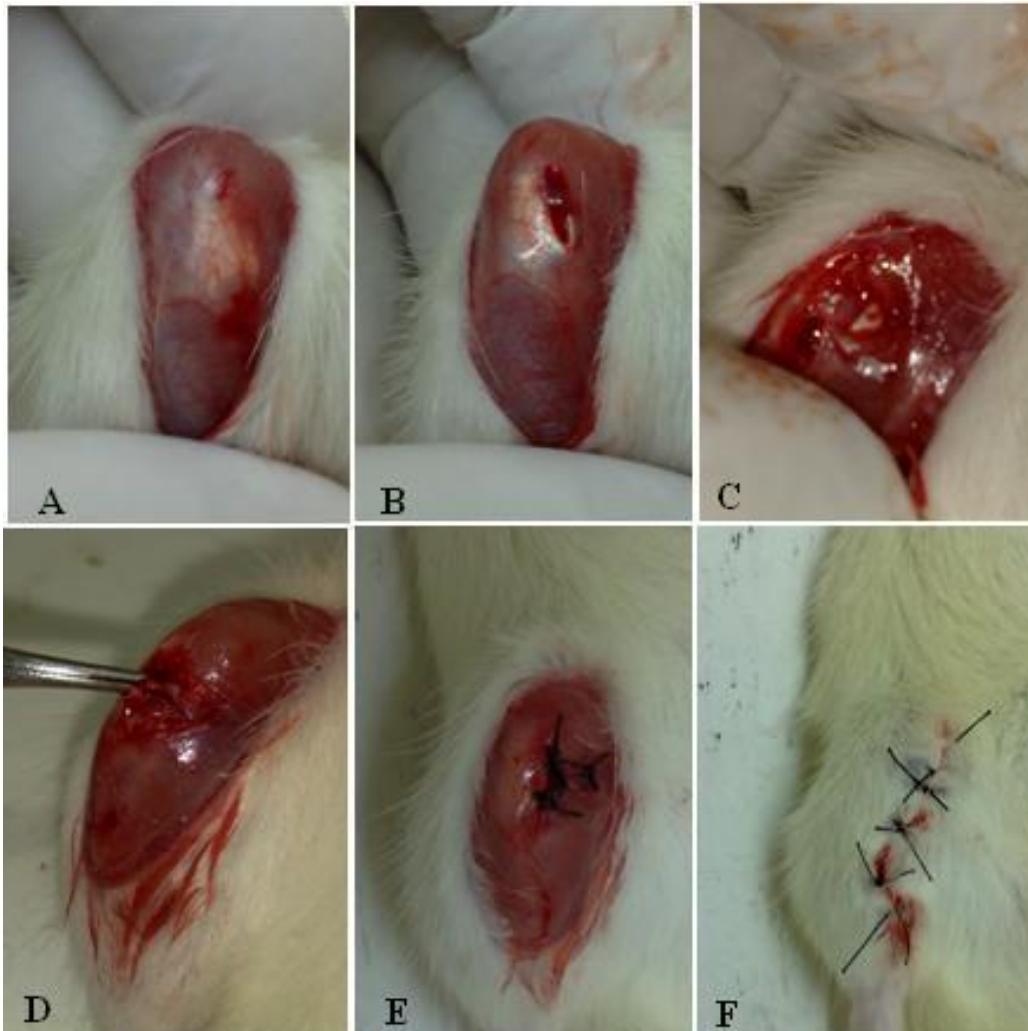


Figura 4 – Procedimento cirúrgico.A – Exposição do joelho. B – Secção da cápsula articular. C – Exposição do ligamento colateral medial. D – Menisco medial pinçado. E – sutura da cápsula articular. F – Sutura da pele.

3.3 Grupos experimentais

De acordo com os testes a serem realizados, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: naive (sem tratamento ou manipulação cirúrgica), falso operado, cirurgia/salina (controle), cirurgia/sinvastatina 1, 10 e 20 mg/Kg, cirurgia/cetoprofeno 10 mg/Kg e naive/sinvastatina.

Os animais do grupo naive não foram submetidos a procedimentos cirúrgicos e receberam água filtrada por gavage. O grupo falso operado foi submetido à cirurgia sham e

recebeu água filtrada por gavagem. O grupo cirurgia/salina (controle) foi submetido à cirurgia completa e também recebeu, via gavagem, apenas água filtrada. Os grupos cirurgia/sinvastatina foram submetidos ao procedimento cirúrgico completo e receberam, via gavagem, sinvastatina 1, 10 ou 20 mg/Kg. O tratamento com sinvastatina foi iniciado três dias antes do procedimento cirúrgico, sendo a droga administrada por gavagem, em suspensão em água filtrada, uma vez ao dia, até a eutanásia dos animais, i.e. 42 dias após a cirurgia, que foi realizada por overdose de anestésico inalatório.

O grupo cirurgia/cetoprofeno foi submetido à cirurgia completa e recebeu água filtrada por gavagem diariamente. Uma hora antes do teste de incapacitância, estes animais receberam cetoprofeno 10 mg/Kg, por via subcutânea. O grupo naïve/sinvastatina não foi submetido à cirurgia e recebeu sinvastatina 20 mg/Kg/dia via gavagem, por 45 dias.

3.4 Avaliação da nocicepção

3.4.1 Teste de Incapacitância

Para a realização do Teste de Incapacitância foram utilizados os grupos cirurgia/salina, falso operado, cirurgia/sinvastatina 1 mg/Kg, cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg, cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg e cirurgia/cetoprofeno 10 mg/Kg. Cada grupo foi constituído por oito animais, com exceção do grupo cirurgia salina, constituído por 16 animais. O teste foi realizado semanalmente, a partir da quarta semana após a cirurgia.

Para determinação do gradiente de distribuição de peso entre os membros inferiores, foi utilizado um aparelho Incapacitance Tester (Linton Instrumentation, Norfolk, UK), de acordo com o protocolo descrito por Bove et al. (2003). Os animais foram colocados em caixas de acrílico específicas, sendo que cada pata traseira foi apoiada sobre uma placa. Após um período de aclimação de pelo menos cinco minutos, foi aferido o peso médio apoiado em cada pata posterior em um período de cinco segundos. O procedimento foi repetido três

vezes, com intervalos de um minuto. Considerou-se como resultado a média da relação entre o peso apoiado nas patas traseiras direita e esquerda. (Figura 5)



Figura 5 – Posição do animal no Incapacitance Tester.

3.4.2 Teste de Hipernocicepção mecânica

Para a realização do teste de hipernocicepção mecânica, foram utilizados animais dos grupos; naïve, naïve/sinvastatina, falso operado, cirurgia/salina, cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg e cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg. Cada grupo foi constituído de cinco animais. O teste foi realizado antes da cirurgia (basal) e a cada 10 dias, por 30 dias.

Antes do teste, os animais foram colocados individualmente nas caixas de acrílico transparente, com fundo de arame, sobre plataforma elevada. Após aclimação por pelo menos trinta minutos, foram realizados 10 ciclos de 10 estímulos não nocivos da parte central da face plantar da pata posterior direita com filamento de von Frey de 8g (FVF, Stoelting, Chicago, USA). Entre cada ciclo, houve um intervalo de um minuto. Em seguida, o procedimento foi repetido na pata contralateral. Cada ciclo em que o animal respondeu aos estímulos com retirada do membro foi considerado positivo. Como resultado, considerou-se o

percentual de ciclos positivos para cada pata, de acordo com o protocolo descrito por Won et al. (2004).

3.4.3 Teste de Hipernociceção Térmica

Para a avaliação da sensibilidade térmica, foram utilizados animais dos grupos: naïve, naïve/sinvastatina, falso operado, cirurgia/salina, cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg e cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg. Cada grupo foi constituído de cinco animais. O teste foi realizado antes da cirurgia (basal) e a cada 10 dias, por 30 dias.

Foi utilizado o protocolo proposto por Hargreaves et al. (1988), com algumas modificações. Utilizou-se um aparelho *Plantar test* (Ugo Basile; modelo 7370, Milão, Itália), composto por uma plataforma plana de acrílico transparente (dimensões: 86 x 35 x 17 cm), dividida em três compartimentos com paredes de acrílico opaco (dimensões: 22 x 19 x 15 cm). Um gerador móvel de calor radiante, localizado sob a plataforma, foi posicionado sob o centro da pata posterior direita do animal e registrou automaticamente a latência para retirada da pata. Foi utilizada intensidade de 35W, sendo o tempo máximo de estimulação de vinte segundos para evitar danos ao animal. Antes do teste foi permitido aos animais aclimatarem-se às caixas por pelo menos 30 minutos. Cada animal foi submetido a três medidas, com intervalos de cinco minutos. Foram consideradas como resultados, as médias das três medidas.

3.4.4 Teste de campo aberto

Para a realização do teste de campo aberto, foram utilizados animais dos grupos: naïve, naïve/sinvastatina, falso operado, cirurgia/salina, cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg e cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg. Cada grupo foi constituído de cinco animais. O teste foi realizado antes da cirurgia (basal) e a cada 10 dias, por 30 dias.

Para tal, foi utilizado aparelho de campo aberto circular, medindo 60 cm de diâmetro, com base de acrílico branco, dividida em quadrantes, e laterais de acrílico transparente, de 50 cm de altura. Os animais foram colocados individualmente no centro do círculo durante cinco minutos, sendo registrados os números de levantamentos (rearings) e de cruzamentos de quadrantes. Entre os testes de diferentes animais, o aparato foi limpo com álcool.

3.5 Análise histológica

Para realização da análise histológica, foram utilizados animais dos grupos cirurgia/salina, falso operado, cirurgia/sinvastatina 1 mg/Kg, cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg e cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg. Os animais foram sacrificados 42 dias após o procedimento cirúrgico e ambos os seus joelhos foram retirados para análise. Cada grupo foi constituído por 8 animais; os joelhos esquerdos, não operados, foram utilizados para comparação.

Os joelhos foram removidos e prontamente fixados em solução de formol 10% tamponado e encaminhados para descalcificação com ácido diaminotetra-acético (EDTA), processamento histológico de rotina e inclusão em parafina. Foram realizados cortes no plano coronal, para permitir a visualização das porções lateral e medial do platô tibial, de 5µm de espessura, em 3 pontos, iniciando a partir da linha média da tíbia, a intervalos de 50 µm. As secções histológicas foram submetidas às colorações de hematoxilina-eosina e azul de toluidina.

Para análise histológica, as lâminas foram numeradas randomicamente, sua avaliação sem identificação de grupo e/ou animal. A intensidade da osteoartrite foi graduada de acordo com o método proposto pela OARSI - Sociedade Internacional de Pesquisa de Osteoartrite (Pritzker et al., 2006). Foram determinados o grau de lesão articular e o estágio, representado pela extensão da lesão. A seguir, os valores obtidos foram multiplicados, resultando no escore

de lesão articular. O resultado da lâmina com maior escore de cada peça foi escolhido para as análises estatísticas. (Anexo 1)

A membrana sinovial foi avaliada pelo valor médio da contagem do número de camadas celulares em quatro campos distintos, dois na membrana sinovial medial e dois na lateral. Para análise, foi considerado o maior valor entre as lâminas de uma mesma peça.

3.6 Imuno-histoquímica

Para realização de análise imuno-histoquímica, animais dos grupos cirurgia/salina, cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg e cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg foram sacrificados 42 dias após a cirurgia e seus joelhos direitos foram retirados. Os joelhos esquerdos do grupo cirurgia/salina também foram retirados para comparação. Cada grupo foi constituído por 5 animais.

Após retirados, os joelhos tiveram o ligamento patelar seccionado transversalmente para facilitar a fixação e colocados em solução de formol 10% tamponado, por 48 horas. Posteriormente, as peças foram descalcificadas em solução de EDTA 10%. A solução de EDTA foi trocada a cada dois dias; o controle de descalcificação foi realizado por pesagem da peça. Quando esta não mais apresentava perda de peso, a descalcificação foi considerada completa. As peças descalcificadas foram lavadas em água destilada por 12 horas e encaminhadas para processamento histológico e confecção de lâminas contendo cortes histológicos em parafina.

Os cortes teciduais de espessura de 3–4 μ m foram montados sobre lâminas preparadas com solução de ATPS (3-aminopropyltriethoxysilene) a 5% em acetona PA, sendo mantidas em estufa a uma temperatura de 50°C durante 1 h para fixação dos cortes. Após fixação, os cortes foram desparafinados através de imersões consecutivas em xilol e rehidratados por passagens sucessivas em etanol em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90%,

80% e 70%). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar reações inespecíficas falso positivas. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% e metanol absoluto (v/v) por 20 min, com posterior lavagem em água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, foi preparada uma solução composta por 180 ml de ácido cítrico 0,1 M e 820 ml de citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0). As lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada e mantidas em banho-maria ajustado para 95–98°C, durante 45 min. Logo após, ainda como parte do processo térmico de reativação antigênica, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 min à temperatura ambiente e lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, estas foram submersas em PBS.

A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2–8°C, durante 12–16 h. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS à temperatura ambiente. Após lavagem os cortes foram incubados com o anticorpo secundário biotilado apropriado em câmara úmida durante 90 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS e a detecção foi realizada com o uso de solução peroxidase-estreptavidina. Após 30 minutos de incubação em câmara úmida à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com PBS e a detecção foi completada com o uso de solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahidrocloro) e 0,3% de peróxido de hidrogênio, seguida de contra-coloração em solução de hematoxilina de Harris, desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em meio de montagem permanente. Para cada reação foi utilizado um controle negativo, com abolição do anticorpo primário nas reações.

Foram utilizados, para análise da porção medial da cartilagem tibial e da membrana sinovial, anticorpos contra a subunidade p65 fosforilada do fator de transcrição NFkappaB (diluição 1:100), contra a enzima caspase-1 (diluição 1:100) e contra a citocina IL-17 (diluição 1:100). Os resultados foram obtidos através de uma câmera digital (Moticam 2300 3MP), acoplada a um microscópio óptico Eclipse 200 (Nikon, Melville, NY, USA).

Foram obtidas três imagens (1280 x 1024 pixels) a partir de cada secção histológica. Devido ao formato irregular dos tecidos, foram escolhidas para análise áreas representativas de cada foto, medindo 640 x 512 pixels para análise das cartilagens, e 640 x 300 pixels para análise das membranas sinoviais. A densidade óptica que melhor discriminou a imunomarcacão (coloração castanha) foi obtida utilizando o programa NIH ImageJ 1.36b. A intensidade total de pixels foi determinada e os dados foram expressos como unidade arbitrária, representativa da densidade óptica (D.O.).

Drogas e reagentes

As seguintes drogas e reagentes foram utilizados: sinvastatina (gentilmente cedida por Genéricos Biosintética, São Paulo, Brasil), cetoprofeno (Profenide^R 100 mg/2ml, gentilmente cedido por Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil), quetamina, xylazina (Vetbrands Saúde Animal, Jacareí, Brasil), álcool etílico absoluto (CPQ, Diadema, Brasil), Xylol (Labsynth, Diadema, Brasil), EDTA (Invitrogen, Auckland, Nova Zelândia), peróxido de hidrogênio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, hematoxilina de Harris (todos de Merck, Alemanha), ácido cítrico, dimetilsufóxido (DMSO), hidróxido de amônia (todas adquiridos de Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), PBS (Laboclin, Pinhais, Brasil), estreptavidina-biotina-peroxidase (Dako Cytomation), solução salina 0,9%.

Os seguintes anticorpos foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, EUA); anti-caspase 1 (referência SC-1597), anti-interleucina 17 (referência SC-7917),

anticorpos anti-IgG de cabra e coelho. O anticorpo anti NFkappaB p65fosforilada (referência 3037) foi adquirido de CellSignaling (EUA).

3.7 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com uso do programa SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chigaco, EUA). Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. A comparação entre múltiplos grupos independentes foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis. Quando esse teste mostrou diferenças significantes, o teste U de Mann-Whitney monocaudado com testes exatos de significância foi empregado para detecção de diferenças entre dois grupos. A comparação de dados escalares derivados de aferições sequenciais foi realizada por análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, seguida por teste de Bonferroni. Os testes foram realizados com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Testes de dor e motilidade

4.1.1 Teste de Incapacitância

Os resultados dos testes de incapacitância estão expressos nas figuras 6, 7 e 8. Na quarta semana após a cirurgia, a relação de distribuição de peso entre as patas posteriores de todos os grupos que receberam sinvastatina diferiu significativamente dos resultados do grupo falso operado, mas não diferiu significativamente em relação ao grupo cirurgia/salina. Os animais do grupo falso operado apresentaram maior proporção de peso apoiado no membro inferior direito (grupo cirurgia/salina: $0,8426 \pm 0,0339$, falso operado: $1,071 \pm 0,022$, cirurgia/sinvastatina 1 mg/Kg/dia: $0,8692 \pm 0,0347$, cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg/dia: $0,7250 \pm 0,0468$, cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg/dia: $0,9364 \pm 0,0625$, $p: < 0,001$). O tratamento dos animais com cetoprofeno 10 mg/Kg aumentou significativamente a proporção de peso apoiada na pata posterior direita em relação ao grupo cirurgia/salina, tornando a distribuição de peso semelhante à do grupo falso operado (grupo cetoprofeno: $1,050 \pm 0,0317$, $p: < 0,001$). (Figura 6)

Na quinta e na sexta semanas após a cirurgia, os resultados do grupo que recebeu sinvastatina 20 mg/Kg foram significativamente diferentes dos resultados do grupo cirurgia/salina, indicando maior proporção de peso descarregado no membro operado ($p: < 0,001$ e $0,026$, respectivamente). Esses resultados não diferiram em relação aos do grupo falso operado. (Quinta semana: grupo cirurgia/salina: $0,8639 \pm 0,0283$, grupo falso operado: $1,045 \pm 0,0182$, grupo cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg/dia: $1,007 \pm 0,0264$. Sexta semana: grupo cirurgia/salina: $0,8931 \pm 0,0369$, grupo falso operado: $1,083 \pm 0,0384$, grupo cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg/dia: $0,9739 \pm 0,0655$) A administração de cetoprofeno

produziu resultados semelhantes na quinta semana ($0,9750 \pm 0,0360$, $p: 0,001$). Quando avaliada na sexta semana, a diferença não atingiu significância estatística em relação ao grupo cirurgia/salina devido ao maior erro padrão ($0,9963 \pm 0,0705$, $p: 0,056$) (figuras 7 e 8)

O tratamento com sinvastatina nas doses de 1 e 10 mg/Kg não foi capaz de produzir diferenças significativas em relação ao grupo cirurgia/salina nos resultados dos testes de incapacitância. (Semana 5: cirurgia/sinvastatina 1 mg/Kg/dia: $0,9235 \pm 0,0199$, cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg/dia: $0,8284 \pm 0,0327$. Semana 6: cirurgia/sinvastatina 1 mg/Kg/dia: $0,8571 \pm 0,0352$, cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg/dia: $0,8360 \pm 0,0456$.) (figuras 6, 7 e 8).

4.1.2 Teste de Hipernociceção mecânica

Os resultados dos testes de hipernociceção mecânica estão expressos nas figuras 9 e 10. A comparação entre os resultados realizada através do teste de ANOVA de medidas repetidas não demonstrou diferenças estatisticamente significantes (membro posterior direito $p: 0,1479$, membro posterior esquerdo $p: 0,7458$).

4.1.3 Teste de Hipernociceção Térmica

Os resultados dos testes de hipernociceção térmica estão apresentados na figura 11. A comparação entre os resultados realizada com teste de ANOVA de medidas repetidas não demonstrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p: 0,1123$)

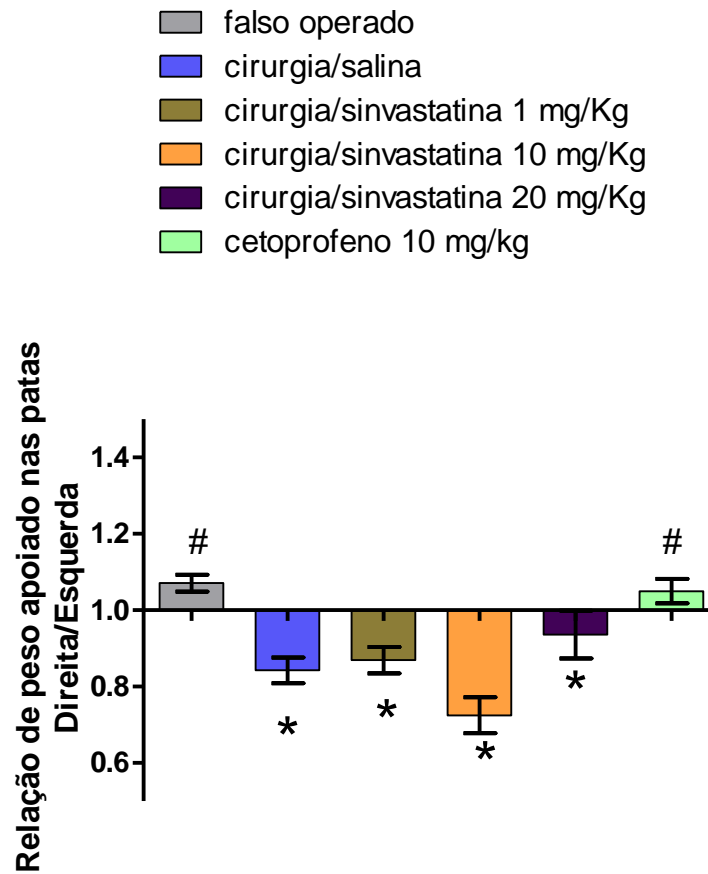


Figura 6 – Relação entre o peso distribuído nos membros posteriores direito e esquerdo dos animais avaliados 4 semanas após a cirurgia. Os resultados estão expressos como a média ± erro padrão da média de 8 a 16 animais por grupo. * - Difere estatisticamente em relação ao grupo falso operado, teste de Mann-Withney, monocaudado. # - diferença estatisticamente significante em relação ao grupo cirurgia/salina, teste de Mann-Withney, monocaudado. Teste de Kruskal-Wallis: p 0,0001.

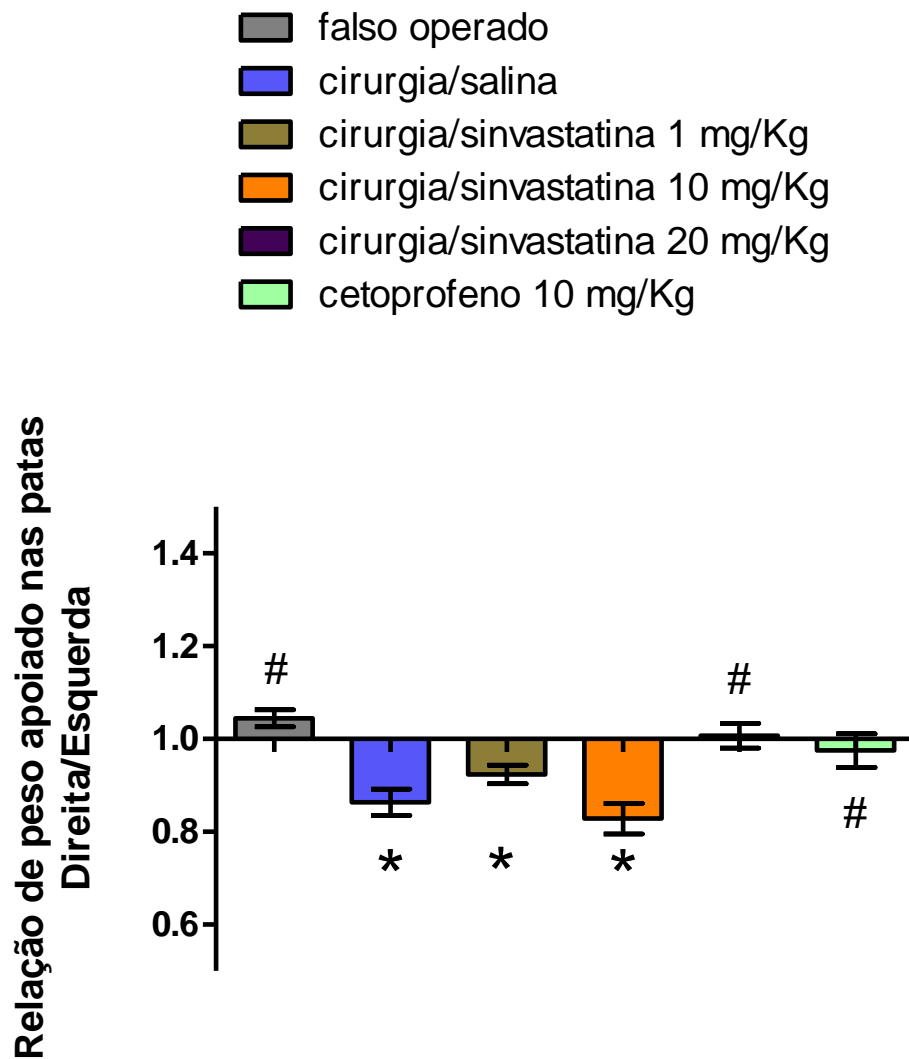


Figura 7 - Relação entre o peso distribuído nos membros posteriores direito e esquerdo dos animais avaliados 5 semanas após a cirurgia. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média de 8 a 16 animais por grupo. * - Difere estatisticamente em relação ao grupo falso operado, teste de Mann-Withney, monocaudado. # - diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo cirurgia/salina, teste de Mann-Withney, monocaudado. Teste de Kruskal-Wallis: $p < 0,0001$.

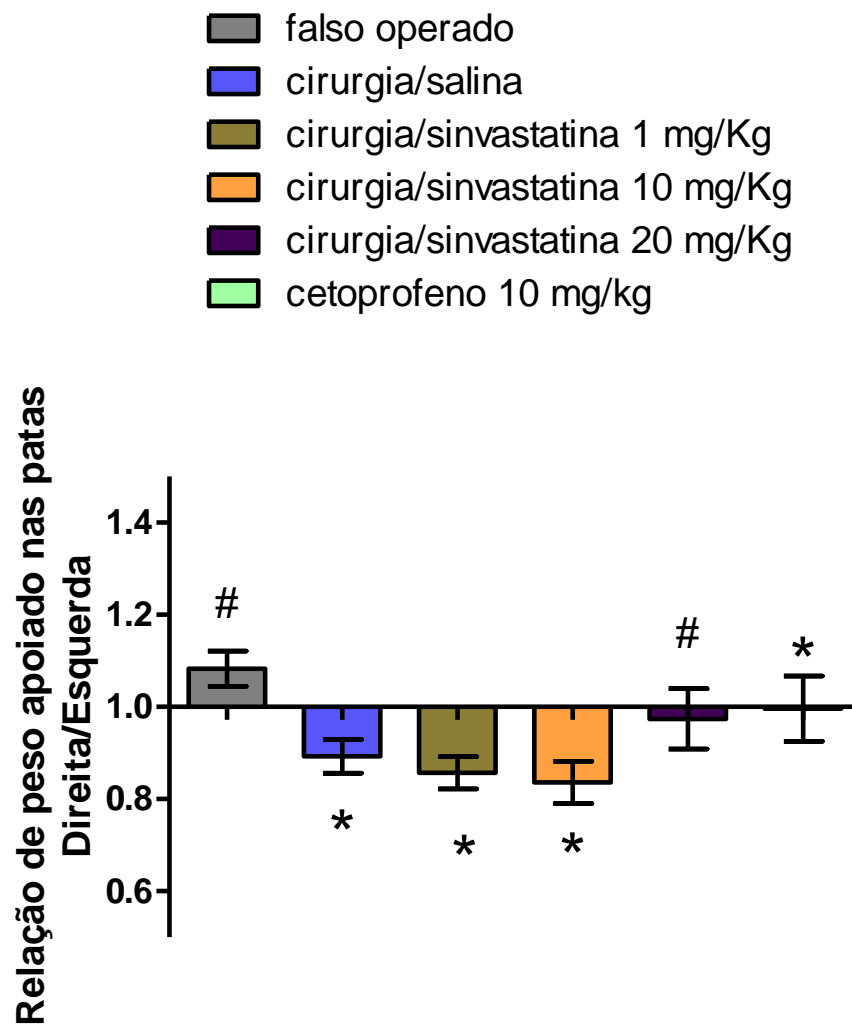


Figura 8 - Relação entre o peso distribuído nos membros posteriores direito e esquerdo dos animais avaliados 6 semanas após a cirurgia. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média de 8 a 16 animais por grupo. * - Difere estatisticamente em relação ao grupo falso operado, teste de Mann-Whitney, monocaudado. # - diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo cirurgia/salina, teste de Mann-Whitney, monocaudado. Teste de Kruskal-Wallis: p 0,003.

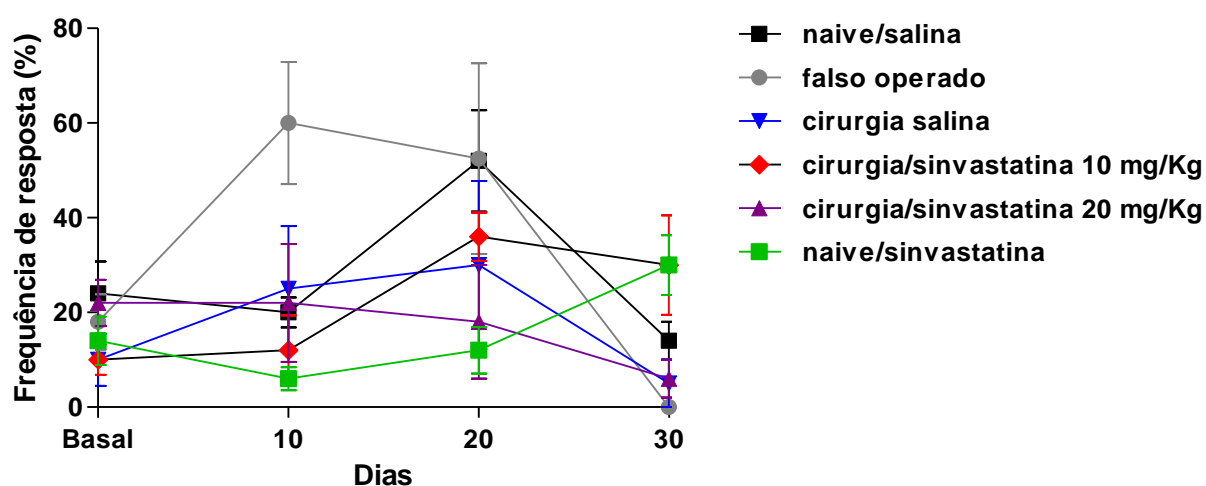


Figura 9 – Frequência de resposta de retirada do membro posterior direito à estimulação com filamento de von Frey, ao início do estudo (basal) e a cada 10 dias. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais por grupo. Diferença ao teste de ANOVA de medidas repetidas p: 0,1479.

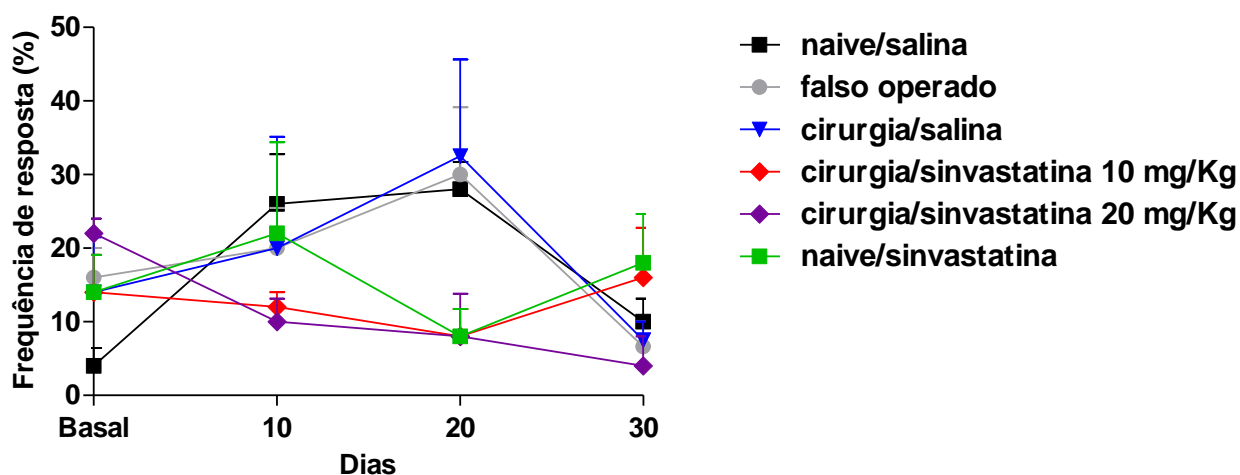


Figura 10 - Frequência de resposta de retirada do membro posterior esquerdo à estimulação com filamento de von Frey, ao início do estudo (basal) e a cada 10 dias. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais por grupo. Diferença ao teste de ANOVA de medidas repetidas p: 0,7458.

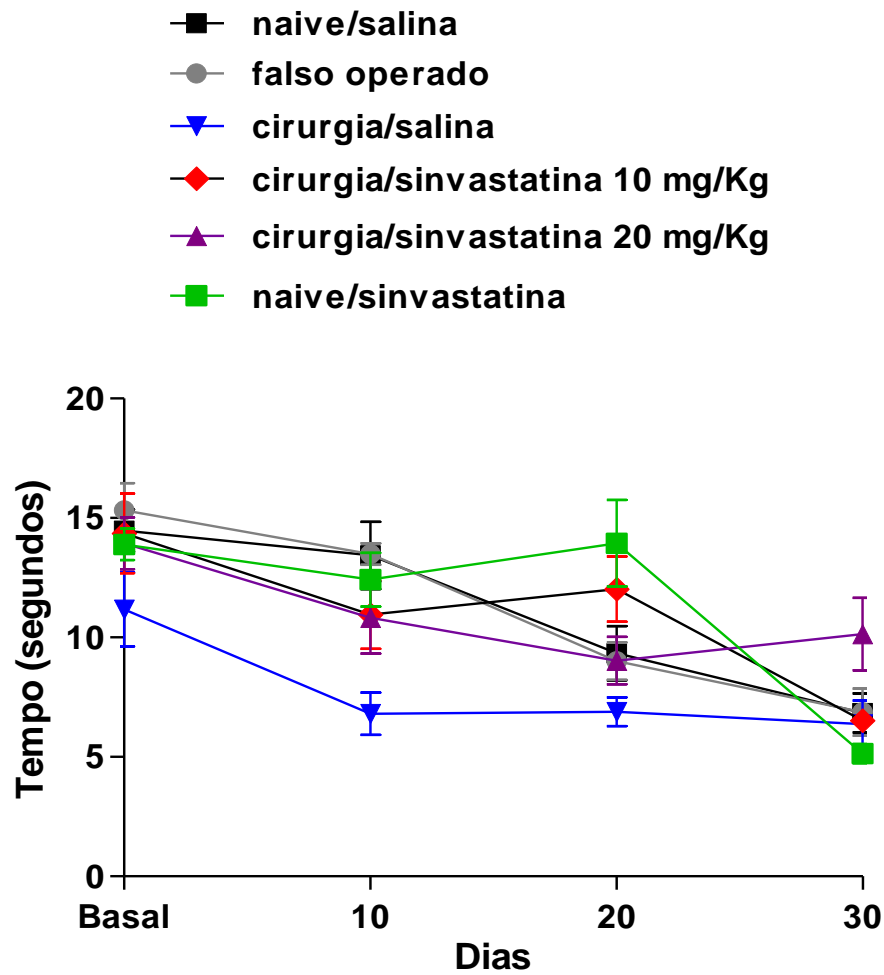


Figura 11 – Tempo de latência de retirada do membro posterior direito em resposta ao estímulo térmico, ao início do estudo (basal) e a cada 10 dias. Os resultados estão expressos em média do tempo de latência para retirada da pata, em segundos \pm erro padrão da média de 5 animais por grupo. Diferença ao teste de ANOVA de medidas repetidas p : 0,1123.

4.1.4 Teste de Campo Aberto

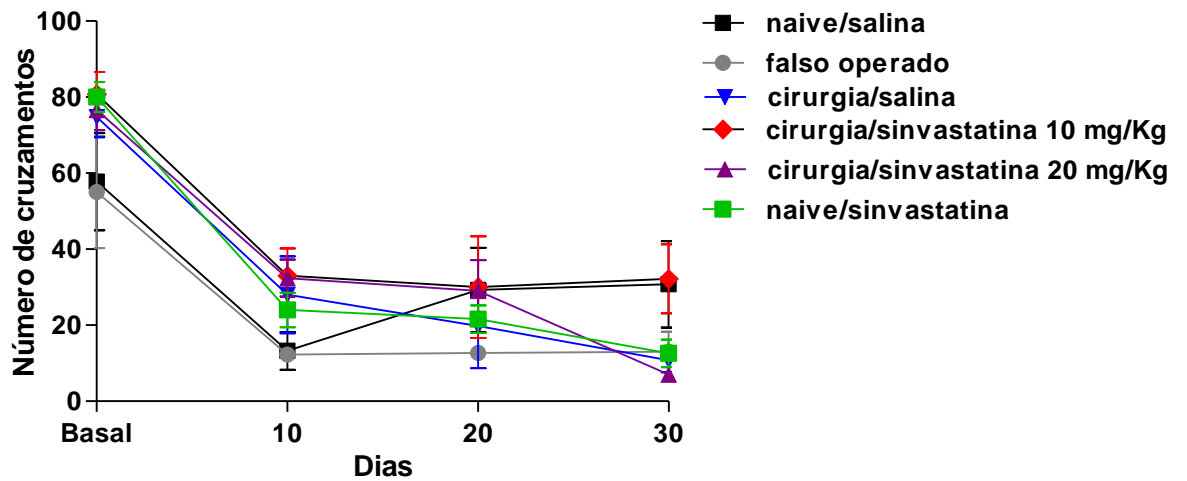
Os resultados do teste de campo aberto estão sumarizados nas figuras 12a e 12b. A comparação entre os resultados realizada pelo teste de ANOVA de medidas repetidas não demonstrou diferenças estatisticamente significantes tanto para o número de cruzamentos de quadrantes, quanto para o de levantamentos (rearings) (p: 0,0662 e 0,4227, respectivamente).

4.2 Análise histológica

Os resultados das análises histológicas estão expressos nas figuras 13 e 14.

Os joelhos direitos dos animais do grupo cirurgia/salina apresentaram os maiores valores de escore OARSI, indicando a presença de avançada osteoartrite ($14,25 \pm 1,216$). Os escores dos joelhos esquerdos, não operados, foram zero, indicando ausência de alterações sugestivas de osteoartrite. Os escores do grupo falso operado também foram próximos de zero ($0,4286 \pm 0,4286$). Os joelhos direitos de todos os grupos que receberam sinvastatina apresentaram escores menores do que os do grupo cirurgia/salina, todavia esta diferença somente alcançou significância estatística para o grupo que recebeu a maior dose de sinvastatina. (grupo cirurgia/sinvastatina 1 mg/Kg/dia: $9,833 \pm 2,889$, cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg/dia: $9,875 \pm 1,1556$, cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg/dia: $6,875 \pm 1,520$). Contudo, os escores dos joelhos operados do grupo que recebeu cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg/dia permaneceram elevados em relação aos joelhos não operados, refletindo o processo degenerativo secundário à intensa instabilidade articular decorrente da cirurgia.

A



B

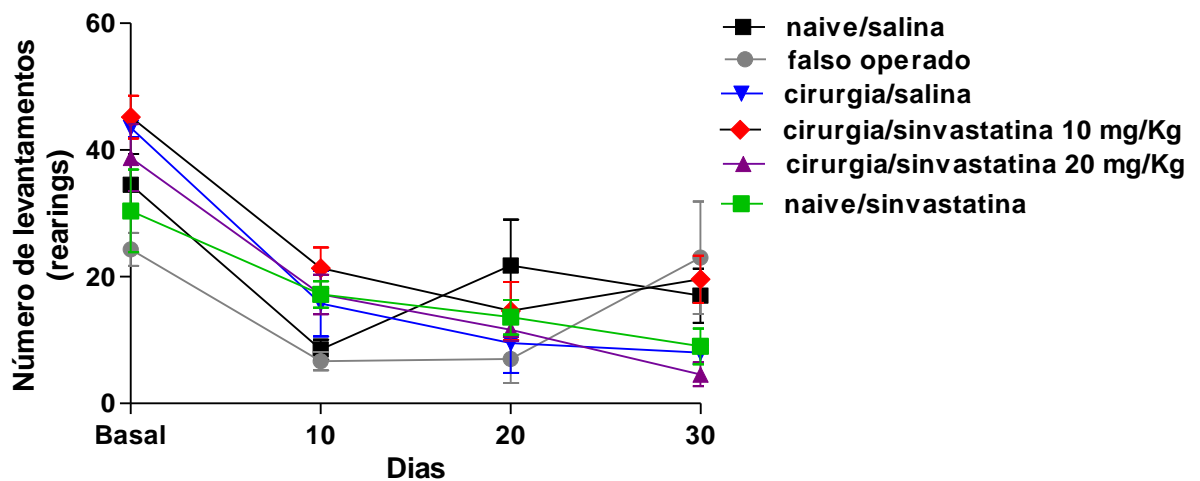
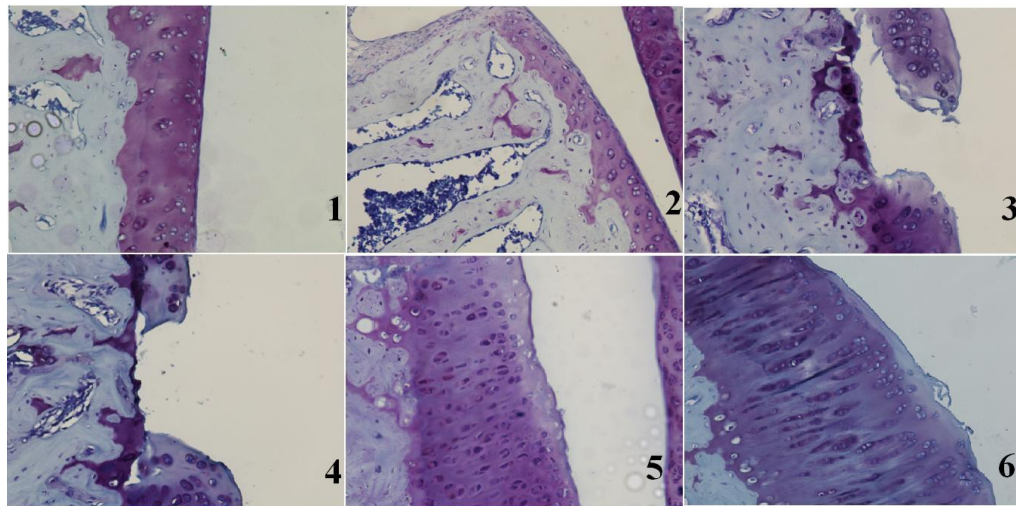


Figura 12 – A - Número de cruzamentos de quadrantes no campo aberto, em um período de 5 minutos, ao início do estudo (basal) e a cada 10 dias. B – Número de levantamentos (rearings) no campo aberto, em um período de 5 minutos, ao início do estudo (basal) e a cada 10 dias. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de grupos de 5 animais. Diferença ao teste de ANOVA de medidas repetidas de cruzamentos e elevações, respectivamente, p : 0,0662 e 0,4227.

A -



B -

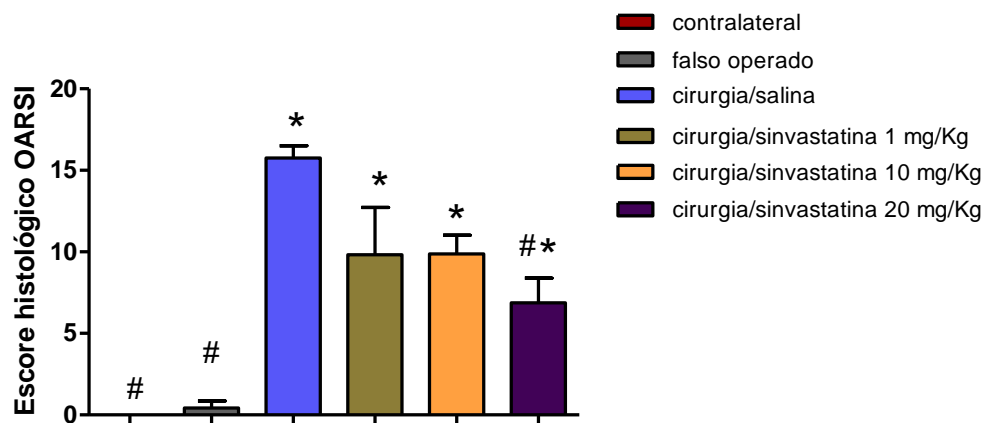
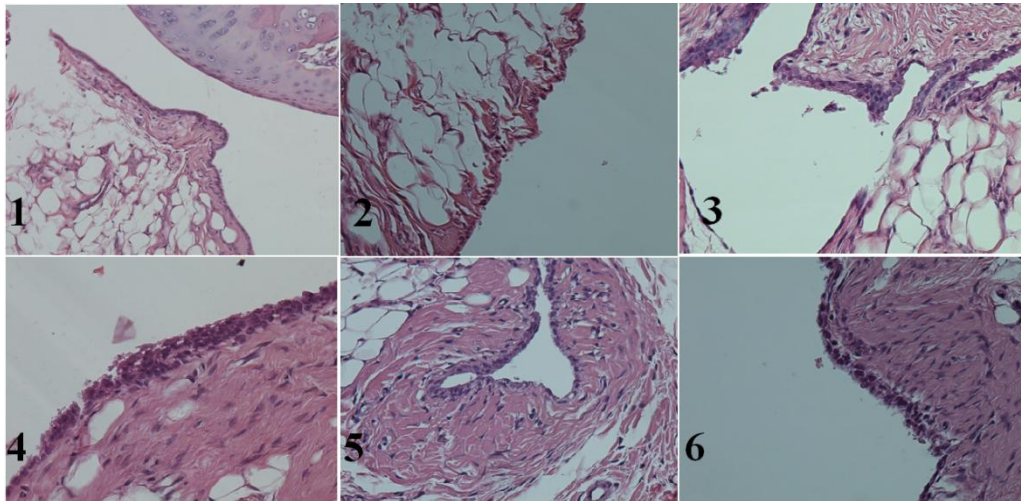


Figura 13 - Avaliação histológica da cartilagem tibial. A - Imagens representativas dos cortes histológicos da cartilagem hialina tibial, corados por azul de toluidina. 1 - Joelho não operado, aspecto histológico normal. 2 - Falso-operado, aspecto histológico normal. 3 - Operado/salina, demonstrando diminuição da coloração pelo azul de toluidina, secundário à perda de glucosaminoglicanos, áreas hipocelulares, presença de clusters de condrócitos e denudação óssea. 4 - Operado/sinvastatina 1 mg/Kg/dia, apresentando diminuição da coloração pelo azul de toluidina, secundário à perda de glucosaminoglicanos, áreas hipocelulares e denudação óssea. 5 - Operado/salina 10 mg/Kg/dia, apresentando redução da coloração por azul de toluidina e hipocelularidade da camada superficial da cartilagem, além de proliferação de condrócitos nas zonas média e profunda. 6 - Operado/salina 20 mg/Kg/dia, apresentando fibrilação, redução da coloração por azul de toluidina, secundária a edema, e hipocelularidade da camada superficial da cartilagem. Aumento original 20x. B - Escores OARSI. Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média de grupos de 8 animais. * - Difere estatisticamente em relação ao joelho não operado (contralateral), teste de Mann-Whitney, monocaudado. # - diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo cirurgia/salina, teste de Mann-Whitney, monocaudado. Teste de Kruskal-Wallis: $p < 0,001$.

A -



B -

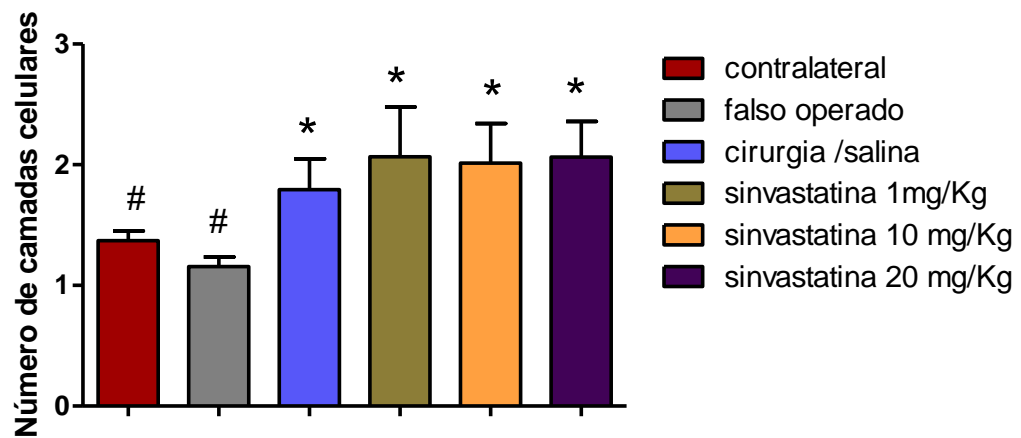


Figura 94 – Avaliação histológica da membrana sinovial. A – Imagens representativas dos cortes histológicos da membrana sinovial, corados por hematoxilina-eosina. 1 – Joelho não operado. 2 – Falso-operado. 3 – Operado/salina. 4 – Operado/simvastatina 1 mg/Kg/dia. 5 – Operado/salina 10 mg/Kg/dia. 6 – Operado/salina 20 mg/Kg/dia. Aumento original 40x. B - Número de camadas celulares da sinóvia. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média de grupos de 8 animais. * - Difere estatisticamente em relação ao joelho não operado (contralateral), teste de Mann-Withney, monocaudado. # - diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo cirurgia/salina, teste de Mann-Withney, monocaudado. Teste de Kruskal-Wallis: p 0,005.

Quanto ao número de camadas celulares da sinóvia, os joelhos não operados (esquerdos) e o grupo falso operado apresentaram as menores médias. A presença de osteoartrite causou aumento do número médio de camadas celulares que, embora estatisticamente significante, revelou-se pouco expressivo. (Joelhos esquerdos; $1,371 \pm 0,0808$, cirurgia/salina $1,793 \pm 0,256$, Falso operado $1,157 \pm 0,0782$, cirurgia/sinvastatina 1 mg/Kg/dia $2,607 \pm 0,4120$, cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg/dia: $2,013 \pm 0,3281$, cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg/dia $2,063 \pm 0,2958$).

4.3 Imuno-histoquímica

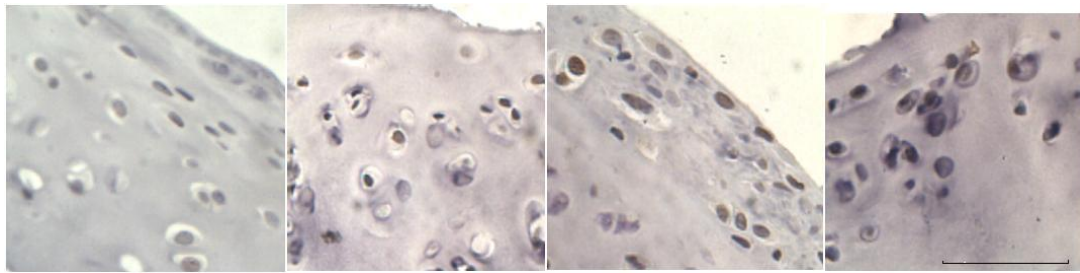
Os resultados da imuno-histoquímica para a subunidade p65 fosforilada do NFkappaB na cartilagem medial da tíbia e na membrana sinovial estão expressos nas figuras 15 e 16. A marcação para o NFkappaB p65 fosforilado encontrada na cartilagem tibial medial foi menor nas amostras de joelhos não operados do que nos joelhos com osteoartrite. A intensidade de marcação detectada nos animais que receberam sinvastatina 10 ou 20 mg/Kg/dia não diferiu da encontrada nas amostras cirurgia/salina. (joelhos não operados: $1,109 \pm 0,3428$, cirurgia/salina $3,331 \pm 0,4434$, cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg/dia: $2,788 \pm 0,2783$, cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg/dia $2,804 \pm 0,305$).

A análise da expressão de NFkappaB p65 fosforilado por imuno-histoquímica na membrana sinovial mostrou expressão significativamente maior nas articulações osteoartríticas em relação aos joelhos esquerdos, não operados. A administração de sinvastatina em ambas as doses diminuiu significativamente a expressão deste fator de transcrição em comparação aos animais do grupo cirurgia/salina. (joelhos não operados: $4,317 \pm 0,4728$, cirurgia/salina $13,24 \pm 1,325$, cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg/dia: $7,185 \pm 0,898$, cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg/dia $8,904 \pm 0,8257$).

Os resultados da imuno-histoquímica para caspase 1 na cartilagem medial da tíbia e na membrana sinovial estão expressos nas figuras 17 e 18. A marcação para caspase 1 na cartilagem foi significativamente mais intensa nos joelhos com osteoartrite não tratados com sinvastatina do que a encontrada nos joelhos esquerdos, não operados. (cirurgia/salina $2,834 \pm 0,5581$, joelhos não-operados $0,3882 \pm 0,1175$). A administração de sinvastatina em ambas as doses, 10 e 20 mg/Kg/dia, proporcionou redução significativa da marcação para essa enzima em relação aos joelhos com osteoartrite de animais não tratados. (cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg $0,4191 \pm 0,1191$, cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg $1,160 \pm 0,166$).

Com relação à membrana sinovial, os valores da marcação para caspase 1 encontrados nas amostras cirurgia/salina, joelhos com osteoartrite de animais que não receberam sinvastatina, não diferiram dos joelhos esquerdos, não-operados. Os valores encontrados nas amostras dos animais que receberam sinvastatina foram significativamente menores do que as dos que não receberam. (joelhos não operados $2,197 \pm 0,4653$, cirurgia/salina $2,290 \pm 0,4301$, cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg $1,093 \pm 0,4689$, cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg $0,9672 \pm 0,2397$).

A



Contralateral

Cirurgia/salina

Cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg

Cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg

B

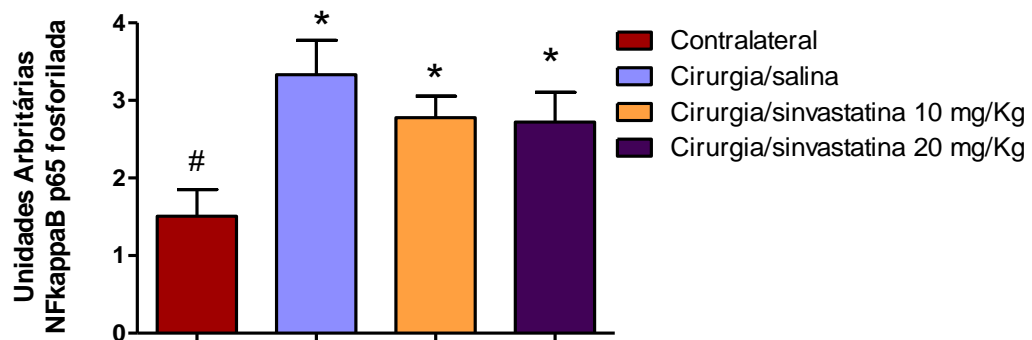
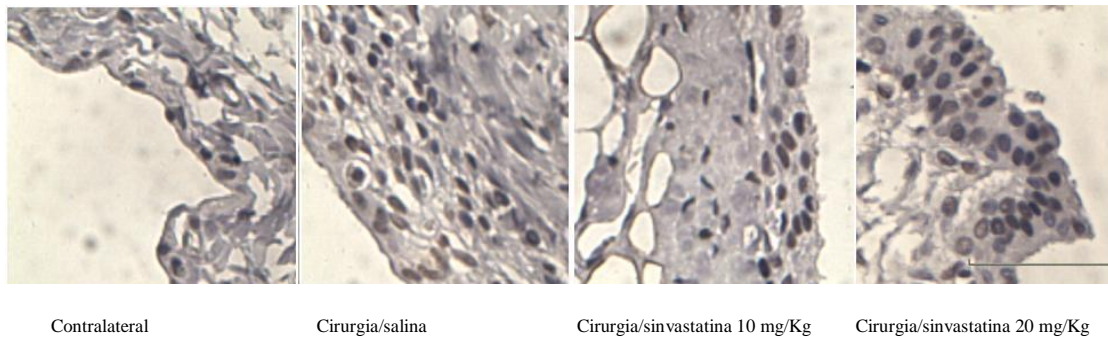


Figura 15 – Análise por imuno-histoquímica da subunidade p65 fosforilada do NFkappaB em cartilagem hialina. A – Imagens representativas. Aumento original 40x. Barra horizontal representa 100 μ m. B - Densidade óptica da marcação para NFkappaB p65 fosforilado em cortes de cartilagem tibial. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média em grupos de 5 animais. * - Difere estatisticamente em relação ao joelho não operado (contralateral), teste de Mann-Withney, monocaudado. # - diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo cirurgia/salina, teste de Mann-Withney, monocaudado. Teste de Kruskal-Wallis: p 0,027.

A



B

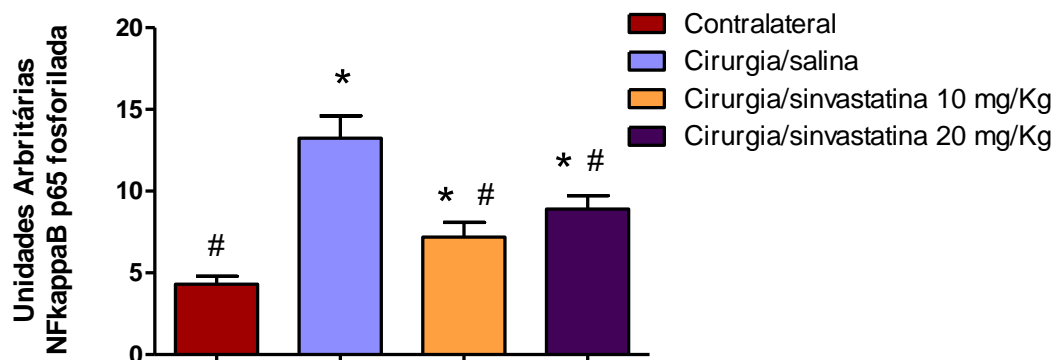
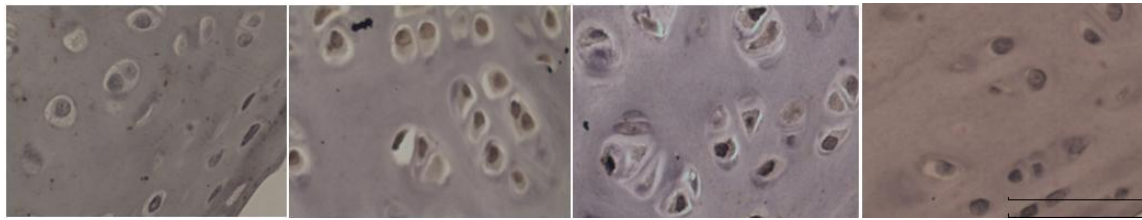


Figura 106 – Análise por imuno-histoquímica de NFkappaB p65 fosforilado em membrana sinovial. A - Imagens representativas. Aumento original 40x. Barra horizontal representa 100 μ m. **B -**Densidade óptica da marcação para NFkappaB p65 fosforilado em cortes de membrana sinovial. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média em grupos de 5 animais. * - Difere estatisticamente em relação ao joelho não operado (contralateral), teste de Mann-Withney, monocaudado. # - diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo cirurgia/salina, teste de Mann-Withney, monocaudado. Teste de Kruskal-Wallis: p - <0,001.

A



Contralateral

Cirurgia/salina

Cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg

Cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg

B

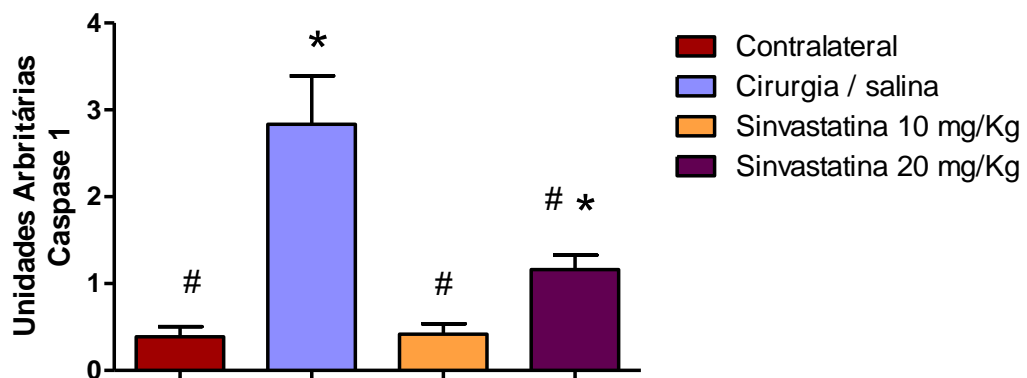
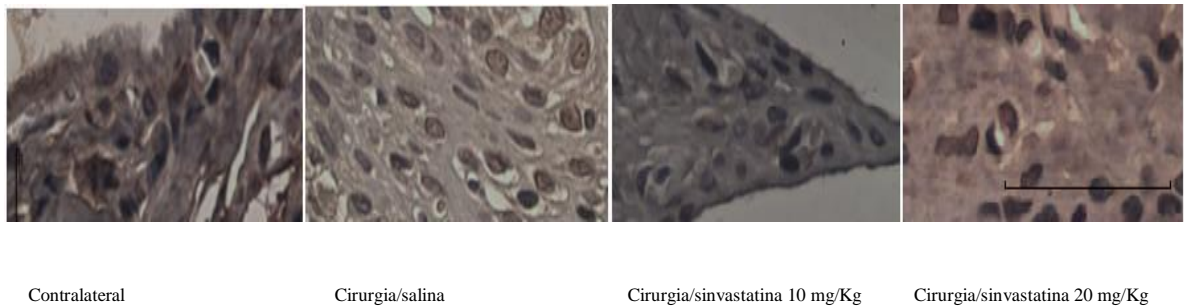


Figura 17 - Análise por imuno-histoquímica da enzima caspase-1 em cartilagem hialina. A –Imagens representativas. Aumento original 40x. Barra horizontal representa 100 μ m. B -Densidade óptica da marcação para caspase 1 em cortes de cartilagem. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média em grupos de 5 animais. * - Difere estatisticamente em relação ao joelho não operado (contralateral), teste de Mann-Withney, monocaudado. # - diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo cirurgia/salina, teste de Mann-Withney, monocaudado. Teste de Kruskal-Wallis: $p < 0,001$

A



B

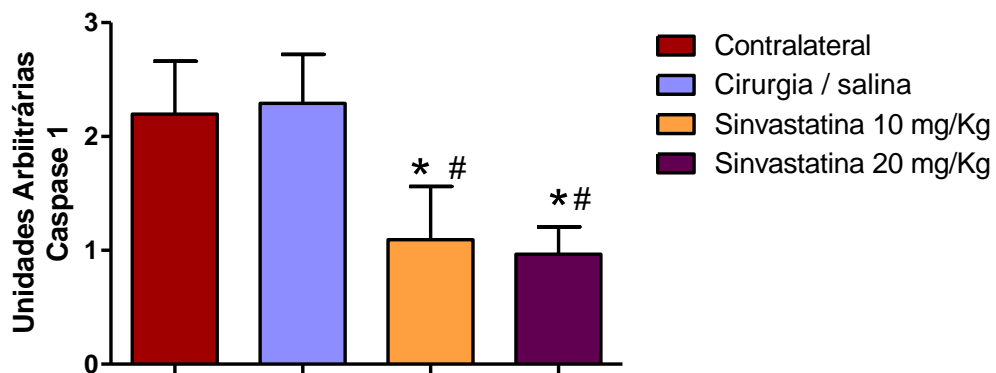
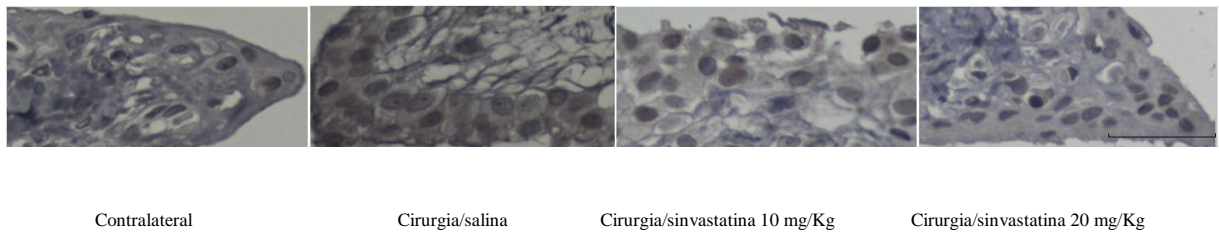


Figura 1811 – Análise por imuno-histoquímica da enzima caspase 1 em membrana sinovial. A – Imagens representativas. Aumento original 40x. Barra horizontal representa 100 µm. B - Densidade óptica da marcação para caspase 1 em cortes de membrana sinovial. Resultados expressos em média ± erro padrão da média em grupos de 5 animais. * - Difere estatisticamente em relação ao joelho não operado (contralateral), teste de Mann-Withney, monocaudado. # - diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo cirurgia/salina, teste de Mann-Withney, monocaudado. Teste de Kruskal-Wallis: p 0,21

A marcação para a IL-17 na cartilagem articular foi muito discreta, estando presente em poucas amostras. Os resultados da análise da interleucina 17 por imuno-histoquímica na membrana sinovial estão representados na figura 23. A intensidade das densidades ópticas da marcação para essa citocina foi maior nas membranas sinoviais das amostras cirurgia/salina do que nas amostras dos joelhos não operados (joelhos não-operados $14,96 \pm 2,339$, cirurgia/salina $31,17 \pm 6,094$). O tratamento com sinvastatina resultou em valores significativamente mais baixos de IL-17 na membrana sinovial em relação às amostras cirurgia/salina (cirurgia/sinvastatina 10 mg/Kg $20,24 \pm 3,571$, cirurgia/sinvastatina 20 mg/Kg $10,89 \pm 2,156$).

A



B

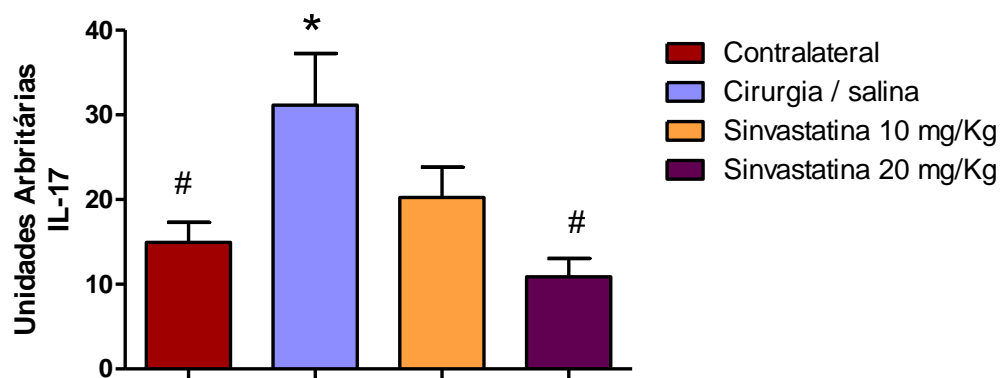


Figura 19 - Análise por imuno-histoquímica da IL-17 na membrana sinovial. A – Imagens representativas. Aumento original 40x. Barra horizontal representa 100 μ m. B - Densidade óptica da marcação para IL-17 em cortes de membrana sinovial. Resultados expressos em média \pm erro padrão da média em grupos de 5 animais. * - Difere estatisticamente em relação ao joelho não operado (contralateral), teste de Mann-Withney, monocaudado. # - diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo cirurgia/salina, teste de Mann-Withney, monocaudado. Teste de Kruskal-Wallis: p 0,036.

5. DISCUSSÃO

A osteoartrite é uma doença decorrente do envelhecimento ou de lesões articulares prévias. Como toda consequência da senescência, sua incidência tende a aumentar com o aumento progressivo da expectativa de vida, alcançado por progressivas melhorias na qualidade de vida e por avanços técnicos no tratamento e na prevenção de diversas doenças. Esse desequilíbrio entre a disponibilidade de tratamento de doenças outrora fatais e a falta de medidas que impeçam o desenvolvimento da osteoartrite fará que, à medida que a população envelheça, aumentem os gastos decorrentes da osteoartrite, incluindo tratamento e perda de capacidade laboral.

O tratamento atual da osteoartrite, composto por medicamentos analgésicos, anti-inflamatórios, medidas fisioterápicas e controle de fatores como a obesidade, proporciona controle satisfatório do quadro algico para grande proporção dos pacientes. Um grupo de drogas denominado “medicamentos sintomáticos de ação lenta na osteoartrite” (Sysadoa) vem sendo utilizado tanto para controle sintomático quanto para tentar estancar ou alentecer a evolução da osteoartrite. No entanto, essas medidas não impedem a evolução contínua da doença, tornando necessário, em casos avançados, uso de próteses articulares. Outro anseio não atendido de diversos pacientes refere-se à prevenção da osteoartrite em pessoas cujo histórico familiar demonstra predisposição ao desenvolvimento da mesma. Por esses motivos, a busca de novas abordagens terapêuticas que possam agir efetivamente sobre a evolução da osteoartrite é imperativa.

A estatinas bloqueiam a síntese de compostos essenciais para a ação de pequenas GTPases, enzimas envolvidas em diversos processos celulares, particularmente na organização do citoesqueleto, na expressão gênica e no transporte nucleocitoplasmático. Essas

propriedades resultam em interferências em processos inflamatórios e no metabolismo ósseo. Embora a osteoartrite não seja caracterizada por um processo inflamatório intenso, a produção de citocinas inflamatórias pela sinóvia e sua ação sobre a cartilagem hialina e o osso subcondral são partes fundamentais de sua patogênese. Por esses motivos, essa classe de drogas poderia apresentar atividade terapêutica sobre a evolução da osteoartrite.

Para investigar a possível ação da sinvastatina sobre a evolução da osteoartrite, foi utilizado, no presente estudo, um modelo de osteoartrite induzida por ressecção ligamentar e meniscectomia parcial, que gera instabilidade articular e reproduz quadros de osteoartrite secundária causados por lesões ligamentares ou meniscais em humanos.

O tratamento dos animais com a sinvastatina resultou em redução significativa do dano condral em relação aos animais que receberam apenas água filtrada. Embora todas as doses testadas de sinvastatina tenham reduzido os escores de dano condral, apenas a dose de 20 mg/Kg/dia produziu redução estatisticamente significativa, ainda que o processo degenerativo não tenha sido completamente abortado. A falha do tratamento em evitar o processo degenerativo condral pode ser devido a efeito insuficiente da droga, mas há que se considerar que o procedimento cirúrgico utilizado no presente estudo causa severa instabilidade articular. A escolha de um modelo mais suave poderia permitir resultados mais expressivos do tratamento, no entanto, a eficácia, ainda que parcial, frente à presença de instabilidade articular importante ressalta a significância dos resultados obtidos.

Estudos com uso de drogas consideradas SYSADOA, utilizadas na prática clínica atual, em modelos experimentais de osteoartrite demonstraram, da mesma forma, proteção apenas parcial contra a evolução da doença. Demonstrou-se que glucosamina, condroitina, combinação de glucosamina e condroitina e diacereína, são capazes de abrandar o dano condral, mas não de aboli-lo (Lippiello et al., 2000; Tiraloche et al., 2005; Rezende et al.,

2006; Smith et al., 1999). Além disso, alguns estudos falharam em demonstrar efeitos benéficos dessas drogas no escores histológicos (Hwa et al., 2001; Cake et al., 2000; Brandt et al., 1997).

Diversas outras drogas vêm sendo estudadas na busca de melhor alternativa terapêutica para a osteoartrite. Em vários trabalhos foi demonstrado redução da intensidade do dano condral, mas não sua abolição completa. Podem ser citados como exemplo doxicilina (Yu et al., 1992), licofelone (Moreau et al., 2006), pioglitazona (Kobayashi et al., 2005), inibidores de MEK 1/2 (Pelletier et al., 2003), inibidores de NOS (Pelletier et al., 2001), inibidores de metaloproteinases (Sabatini et al., 2005) e antagonistas do receptor da IL-1 (Caron et al., 1996).

O modelo utilizado no presente estudo emula quadros de osteoartrite secundária em humanos. Embora grande parte dos casos de osteoartrite encontrados na prática clínica seja considerada secundária, as respostas obtidas nesse tipo de modelo poderiam não se aplicar à osteoartrite primária, a forma mais comum da doença. O parco conhecimento atual sobre a etiologia da osteoartrite primária não permite esclarecer essa dúvida, mas, ao menos do ponto de vista histológico, as alterações articulares produzidas pelo modelo utilizado no presente estudo assemelham-se às encontradas na osteoartrite primária. Essa semelhança torna possível, em tese, extrapolar os resultados encontrados em modelos cirúrgicos de osteoartrite para formas de osteoartrite, primárias ou secundárias, em humanos. Deve ser enfatizado, ainda, que, no presente estudo, o tratamento com sinvastatina foi capaz de atenuar o processo degenerativo em um modelo caracterizado por severa instabilidade articular e acelerado desenvolvimento de osteoartrite. A osteoartrite primária é, em geral, um processo de evolução mais lenta o que poderia determinar, teoricamente, melhor resposta ao tratamento.

A limitada capacidade de recuperação da cartilagem hialina é um dos aspectos centrais da osteoartrite e o que a torna, atualmente, irreversível. Uma droga profilática ideal deveria ser capaz de impedir a degeneração inicial dessa estrutura articular, enquanto que o tratamento ideal deveria ser capaz de reconstituir a cartilagem a seu estado habitual, bloqueando o ciclo vicioso da osteoartrite. Enquanto tais tratamentos não se tornam realidade, devemos focar em medidas capazes de impedir ou retardar sua evolução.

Não obstante ser a dor um dos motivos, ao lado da incapacidade funcional, que justificam e norteiam o tratamento da osteoartrite, esse sintoma não possui relação direta com o processo degenerativo da cartilagem, uma vez que essa estrutura não é inervada. Outrossim, é comum encontrar pessoas assintomáticas portadoras de osteoartrite. Diversas estruturas podem ser responsáveis pela dor da osteoartrite, incluindo a membrana sinovial, a cápsula articular, o osso subcondral, o periósteo, tendões e ligamentos. Embora várias substâncias presentes na articulação osteoartrítica, como as prostaglandinas e o óxido nítrico, possam causar dor, o quadro algico pode ser decorrente, em diversos casos, de lesão ou sobrecarga de estruturas periarticulares, secundárias a alterações anatômicas, restrição do uso da articulação lesada, retração ligamentar, entre outras causas (Kean et al, 2004; Dieppe, Lohmander, 2005; Hunter et al, 2008).

No presente estudo, foi demonstrado que a administração de sinvastatina, à semelhança do cetoprofeno, aumentou significativamente a proporção de peso apoiado no membro lesado, representando redução da restrição funcional secundária à osteoartrite. Esse teste baseia-se no fato de que a dor da osteoartrite é tipicamente mecânica, ou seja, desencadeada por movimentos ou carga articular. Assim, para evitar a dor, os animais evitariam apoiar o peso na pata lesada.

O papel da dor na distribuição de peso em articulações afetadas por osteoartrite é demonstrado pelos efeitos de anti-inflamatórios não esteroidais, como o cetoprofeno, que aumentam a descarga de peso no membro afetado. No entanto, se é possível afirmar que uma dose única de cetoprofeno altera o resultado do teste de incapacitância em direção ao normal em decorrência apenas de seus efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, o mesmo não se pode afirmar a respeito do tratamento prolongado com a sinvastatina. Embora seja provável que a redução da intensidade da lesão articular pela sinvastatina resulte em diminuição da dor e já tenha sido fartamente documentado que sinvastatina é capaz de reduzir processos inflamatórios, outros fatores presentes em uma doença articular crônica podem alterar os resultados do teste de incapacitância. É provável que a alteração da distribuição de peso nas patas posteriores não se deva apenas à dor, mas também a outros fatores secundários à osteoartrite, incluindo hipotrofia muscular e inibição reflexa da ativação muscular (Hubley-Kozey et al., 2006; Hurley, Newham, 1993). Minorando a lesão articular, a administração de sinvastatina também pode ter influído nesses fatores.

Infelizmente, não foi possível, no presente estudo, demonstrar através de outros testes se a sinvastatina é capaz de reduzir a dor associada à osteoartrite, já que não encontramos diferenças entre animais controles e com osteoartrite nos testes de sensibilidade tátil e térmica. Esse resultado não era de todo inesperado, tendo em vista que diferentes estudos demonstraram respostas variáveis a esses testes em modelos de osteoartrite (Fernihough et al., 2004; Vonsy et al., 2008; Bove et al., 2006).

O fator de transcrição NFkappaB é fundamental na osteoartrite, participando das vias de sinalização da IL-1 beta e do TNF alfa. O assim chamado fator de transcrição NFkappaB é, na verdade, uma família de fatores de transcrição com cinco membros: c-Rel, RelA (p65), RelB, NFkappaB1 (p50/p105) e NFkappaB2 (p52/p100). Quando inativas, essas proteínas estão conjugadas no citoplasma com seus inibidores IkappaB. Uma vez ativados, as proteínas

NFkappaB migram para o núcleo onde se ligam a sequências específicas de DNA e ativam genes relacionados, em sua maioria, a processos inflamatórios. A ativação do NFkappaB pode ocorrer através das chamadas vias canônica e alternativa. A via canônica, deflagrada pela ativação de receptores celulares como para TNF alfa e IL-1 beta, resulta na ativação de quinases do IkappaB (IKKs) alfa e beta, associadas a uma subunidade regulatória chamada modulador essencial do NFkappaB (NEMO). Essas enzimas fosforilam o IkappaB, liberando as proteínas do NFkappaB que, sob a forma de dímeros são translocadas para o núcleo. Os dímeros formados por essa via são, mais comumente p50/p65. A via alternativa, ativada por receptores como o receptor ativador de NFkappaB (RANK), depende exclusivamente da ativação de IKK alfa, que fosforila a proteína NFkappaB2, resultando em dímeros de p52 e RelB. Esses fatores de transcrição, uma vez no núcleo celular, ativam genes distintos dos ativados pela via canônica (Brown, Claudio, Ulrich, 2008). A importância do fator de transcrição NFkappaB nas vias de sinalização intracelulares de citocinas relevantes na osteoartrite, particularmente IL-1 beta e TNF alfa motivou a realização de imuno-histoquímica para identificar se a administração de sinvastatina poderia interferir em sua expressão na cartilagem e/ou na membrana sinovial em articulações osteoartíticas.

Conforme esperado, os valores da fração p65 fosforilada do NFkappaB encontrados no presente estudo foram maiores nas articulações com osteoartrite do que nas articulações normais, tanto na cartilagem tibial, quanto na membrana sinovial. Na literatura apenas um trabalho relata a expressão da fração p65 do NFkappaB em cartilagens degeneradas em comparação a cartilagens normais, embora esse trabalho tenha comparado meniscos, compostos por fibrocartilagem, e não a cartilagem hialina. Papachristou et al. (2008) encontraram níveis maiores de NFkappaB p65 em meniscos degenerados, em comparação a meniscos sem evidências histológicas de degeneração. Já o aumento da expressão do NFkappaB p65 em membranas sinoviais de articulações inflamadas, incluindo articulações

osteoartríticas está bem estabelecido na literatura (Benito et al., 2004; Simmonds, Foxwell, 2008; Handel et al., 1995).

A diminuição de expressão, fosforilação e translocação para o núcleo, da subunidade p65 do NFkappaB após tratamento com sinvastatina já fora descrita antes em fibroblastos, sinoviócitos, macrófagos e células mesoteliais mas não em condrócitos (Ahn et al., 2007; Mikael, Rozen, 2008; Haslinger et al., 2003). Segundo demonstrado por Xu et al. (2006), a inibição da translocação de p65 para o núcleo se deve à inibição da ação da Rho quinase pela sinvastatina.

O presente estudo demonstra, pela primeira vez, o aumento da expressão do NFkappaB p65 fosforilado em cartilagens hialinas de articulações com osteoartrite. Além disso, demonstra que o tratamento com sinvastatina diminui significativamente os níveis de NFkappaB p65 fosforilado na membrana sinovial. Embora a marcação para essa proteína na cartilagem hialina tenha sido menor nas articulações osteoartríticas dos animais tratados com sinvastatina em comparação com os animais que receberam salina, essa diferença não alcançou significância estatística. Esse fato poderia sugerir que os efeitos das estatinas nas articulações osteoartríticas se dão, principalmente, por sua ação na membrana sinovial, conforme proposto por Akasaki et al. (2009). É provável, no entanto, que a sinvastatina realmente iniba a função do NFkappaB na cartilagem hialina, à semelhança de seus efeitos em outros tecidos. Novos estudos serão necessários para confirmar essa hipótese.

A presente demonstração da redução dos níveis de NFkappaB p65 fosforilado na membrana sinovial, local de origem da maior partes das citocinas inflamatórias presentes nas articulações osteoartríticas, induzida pelo tratamento com sinvastatina indica que esse pode ser um dos mecanismos pelos quais esse medicamento reduz a progressão da osteoartrite. Ressaltando a importância desse achado, foi demonstrado anteriormente por Chen et al.

(2008) que a inibição da expressão de NFkappaB p65 em modelo de osteoartrite através de transfecção de adenovírus portando RNA inibitórios reduz a inflamação sinovial, a lesão condral e os níveis de IL-1 beta e de TNF alfa no líquido sinovial.

A caspase 1, também conhecida como enzima conversora da interleucina 1, regula a secreção de IL-1 beta e de IL-18 ao clivar suas formas imaturas. Essa enzima está presente em complexos denominados inflamassomas, juntamente com proteínas NLRs (receptores ligantes de nucleotídeos contendo domínios ricos em repetições de leucina) e ASC. As proteínas NLRs são membros do grupo de sensores intracelulares de reconhecimento de padrão (PRRs), ativadas por diversos estímulos, incluindo proteínas virais e bacterianas, cristais (Sutterwala, 2007; Martinon, Mayor, Tschopp, 2008; Sidiropoulos et al., 2007). Não está claro quais fatores estão envolvidos na ativação da caspase 1 na osteoartrite, embora os níveis aumentados de IL-1 beta indiquem que essa ativação ocorre. Os cristais de cálcio presentes no líquido sinovial de articulações com osteoartrite poderiam contribuir para esse processo.

Foram encontrados, no presente estudo, níveis aumentados de caspase 1 na cartilagem articular, mas não foram detectadas diferenças significativas entre a expressão de caspase 1 nas membranas sinoviais de articulações com osteoartrite quando comparadas com articulações normais. Achados semelhantes foram reportados por Boileau et al. (2002) em cartilagem osteoartrítica em cães. Já Saha et al. (1999), encontraram maiores quantidades de células positivas para caspase-1 em amostras de tecido de pacientes com osteoartrite em comparação a amostras de articulações normais não somente na cartilagem, mas também na membrana sinovial. Embora a presença de maiores quantidades de caspase 1 não seja indicativo de sua efetiva atividade enzimática, os níveis aumentados encontrados na cartilagem osteoartrítica poderiam estar associados à maior síntese local de IL-1 beta na osteoartrite. O encontro, no presente trabalho, de níveis semelhantes de caspase 1 nas

membranas sinoviais de articulações com osteoartrite e normais poderia ser devido à expressão constitucional dessa enzima nesse tecido. De acordo com essa hipótese, nos processos de osteoartrite haveria maior atividade enzimática, mas não necessariamente maior expressão de caspase 1. Estudos adicionais serão necessários para averiguar essa hipótese, já que não há outros estudos além do de Saha et al. (1999) que relatem os níveis dessa enzima em articulações normais.

De modo interessante, a administração de sinvastatina reduziu os níveis de caspase-1 tanto na sinóvia quanto na cartilagem hialina. Não há relatos prévios na literatura dos efeitos das estatinas sobre a expressão da caspase 1, mas há evidências de que as estatinas podem reduzir os níveis de seu produto, a IL-1 beta, em alguns modelos, incluindo modelos de nefropatia (Zhang et al., 2008) e de aneurismas cerebrais (Aok et al., 2008). Por outro lado, outros estudos apontam que, em monócitos, as estatinas podem ativar caspase 1, levando à secreção de IL-1 beta (Montero et al., 2004; Mandey et al., 2006; Kuijk et al., 2008).

A diminuição dos níveis de caspase 1 pelo tratamento com sinvastatina fornece um grande indicativo acerca dos mecanismos de ação desse medicamento na prevenção da osteoartrite. Sua menor expressão resultaria, teoricamente, em menor síntese de IL-1 beta, citocina chave no processo de degradação condral. A redução dos níveis de IL-1 beta poderia resultar em menor progressão da osteoartrite, conforme exemplificado pela amenização da degradação condral em modelo de osteoartrite após transferência de sinoviócitos transfectados com antagonista do receptor da IL-1 (IL1-Ra) (Zhang et al., 2004). Além disso, foi demonstrado que o a diacereína, droga capaz de reduzir a evolução de osteoartrite em alguns estudos, exerce seus efeitos, ao menos em parte, pela redução da atividade de IL-1 beta (Boileau et al., 2008, Martel-Pelletier et al., 1998, Yaron et al., 1999).

A interleucina 17 é uma citocina pró-inflamatória produzida por linfócitos T helper 17 e, de modo menos importante, por neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T de memória. A ativação de seu receptor ativa TRAF6 e NFkappaB, induzindo a expressão de TNF alfa, IL-1 beta e RANKL. Atenção crescente vem sendo dada ao papel da IL-17 em diversos processos inflamatórios crônicos (Shahrara et al., 2008; Lubbert, 2008). Há escassos dados na literatura sobre os níveis de IL-17 em articulações com osteoartrite, embora sua contribuição potencial na gênese da lesão condral já tenha sido demonstrada (Honorati et al., 2002; Martel-Pelletier et al., 1999). Huebner e Kraus (2006) encontraram níveis aumentados da IL-17 em uma linhagem de cobaias suscetíveis a osteoartrite quando comparados a outra linhagem, não-suscetível. No entanto, Maccoux et al. (2007) não detectaram aumento de IL-17 em tecidos de cães com osteoartrite, tampouco encontraram Honorati et al. (2001) em pequeno número de amostras de biópsias sinoviais de pacientes com osteoartrite.

Contrastando com esses resultados, o presente estudo demonstrou aumento dos níveis de IL-17 na membrana sinovial de articulações com osteoartrite quando comparadas com articulações normais. Além disso, o tratamento com sinvastatina reduziu, de modo dose-dependente, o aumento da expressão dessa citocina em articulações com osteoartrite. A redução dos níveis de IL-17 pelo tratamento com sinvastatina já fora demonstrada em linfócitos TH-17 (Zhang et al. 2008), mas não em articulações. De extremo interesse acerca deste tópico é a recente demonstração de que a sinvastatina é capaz de inibir a diferenciação de linfócitos TH₀ em TH17 (Kagami et al., 2009). Esse mecanismo poderia explicar a redução dos níveis dessa citocina encontrados no presente estudo em animais tratados com sinvastatina. A diminuição da IL-17 pode ter contribuído para a redução do dano condral secundária à administração de sinvastatina, no entanto, como o papel dessa citocina na osteoartrite não está claro, outros estudos serão necessários para confirmar essa hipótese.

Embora os dados preexistentes na literatura sugerissem um provável efeito benéfico da sinvastatina na osteoartrite através do bloqueio das vias de sinalização de citocinas que estimulam o catabolismo da cartilagem, efeitos contrários também poderiam ter ocorrido, advindos do bloqueio de vias pró-anabólicas. Foi reportado que as estatinas são capazes de bloquear a ação do TGF beta em diversas linhagens celulares, como células epiteliais (Murphy et al., 2008) e fibroblastos (Burke et al., 2009). Essa inibição, que parece se dever à inibição da fosforilação de Smad 3 (Burke et al., 2009), poderia inibir mecanismos de reparação da cartilagem hialina e agravar a lesão condral. Por outro lado, o bloqueio da ação do TGF beta também poderia ter efeitos benéficos, ao inibir a formação de osteófitos.

Apesar de membros específicos das vias de sinalização do TGF beta não terem sido analisados no presente estudo, uma possível ação inibitória da sinvastatina parece não ter efeitos deletérios sobre a cartilagem íntegra, uma vez que a análise histológica não diferiu entre os joelhos não operados dos animais que receberam a droga e dos que receberam apenas água destilada. Já nos joelhos osteoartíticos, uma possível inibição da ação de fatores anabólicos não parece ter prejudicado o efeito benéfico global da sinvastatina.

Apesar das estatinas serem drogas de fácil acesso e de custo não muito elevado, seu possível uso clínico para tratamento da osteoartrite poderia ser limitado pelas altas doses necessárias, sabidamente relacionadas à maior incidência de efeitos colaterais, particularmente mialgia e miopatia. A necessidade de altas doses provavelmente se deve ao grande metabolismo de primeira passagem, ideal para o tratamento de dislipidemias, mas que limita a ação sobre tecidos periféricos. Os resultados do presente estudo demonstram que drogas que bloqueiam a ação de pequenas GTPases podem ser eficazes no tratamento da osteoartrite. Essas drogas poderiam ser estatinas como menor metabolismo de primeira passagem ou pró-drogas com metabolização em tecidos periféricos. Estudos clínicos serão

necessários para definir a real eficácia de diferentes estatinas no tratamento da osteoartrite em humanos.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a administração de sinvastatina é capaz de reduzir a gravidade histológica da osteoartrite em um modelo animal de instabilidade articular. A diminuição do dano condral está associada à redução da incapacidade funcional aferida pelo teste de incapacitância de intensidade comparável à proporcionada pela administração de cetoprofeno. Estudos com imuno-histoquímica indicaram que os efeitos da sinvastatina podem ser mediados, ao menos em parte, pela diminuição dos níveis de NFkappaB p65 fosforilado, caspase 1 e interleucina 17. A partir dos resultados desse estudo, pode-se concluir que as estatinas apresentam potencial terapêutico para a osteoartrite, o que somente poderá ser definido após a realização de estudos clínicos.

REFERÊNCIAS

Ahn BB, Sethi KS, Aggarwal G. “Simvastatin Potentiates TNF--Induced Apoptosis through the Down-Regulation of NF-B-Dependent Antiapoptotic Gene Products: Role of IB Kinase and TGF--Activated Kinase-1.” *J Immunol* 178: 2507-16, 2007.

Ahn KS, Sethi G., Chaturvedi M.M., Aggarwal B.B. “Simvastatin, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, suppresses osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand through modulation of NF-kappaB pathway.” *Int J Cancer*. 123:1733-4., 2008.

Aigner T, Zhu Y, Chansky HH, Matsen FA 3rd, Maloney WJ, Sandell LJ. “Reexpression of type IIA procollagen by adult articular chondrocytes in osteoarthritic cartilage.” *Arthritis Rheum* 42: 1443–50, 1999.

Aigner T., Dietz U, Stob H, von der Mark, K. “Differential expression of collagen types I, II, III, and X in human osteophytes.” *Lab Invest*. 73:236–43, 1995.

Akasaki Y, Matsuda S, Nakayama K, Fukagawa S, Miura H, Iwamoto Y. “Mevastatin reduces cartilage degradation in rabbit experimental osteoarthritis through inhibition of synovial inflammation.” *Osteoarthritis Cartilage*. 17:235-43, 2009.

Ameye MF, Young LG. “Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the ‘Holy Grail’.” *Curr Opin Rheumatol*. 18:537-47, 2006.

Andriamanalijaona R, Felisaz N, Kim SJ, King-Jones K, Lehmann M, Pujol JP, Boumediene K. “Mediation of interleukin-1beta-induced transforming growth factor beta1 expression by

activator protein 4 transcription factor in primary cultures of bovine articular chondrocytes: possible cooperation with activator protein 1.” *Arthritis Rheum.* 48:1569-81, 2003.

Aok IT, Kataoka H, Ishibashi R, Nozaki K, Hashimoto N. “Simvastatin Suppresses the Progression of Experimentally Induced Cerebral Aneurysms in Rats.” *Stroke.* 39:1276-85, 2008.

Appleton CT, McErlain DD, Pitelka V, Schwartz N, Bernier SM, Henry JL, Holdsworth DW, Beier F. “Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis.” *Arthritis Res Ther.* 9: R13, 2007.

Armitage J. “The safety of statins in clinical practice.” *Lancet.* 370:1781-90., 2007.

Arsever CL, Bole, GG. “Experimental osteoarthritis induced by selective myectomy and tendotomy.” *Arthritis Rheum.* 29:251–61, 1986.

Ashraf S, Walsh, D.. “Angiogenesis in osteoarthritis.” *Curr Opin Rheumatol* 20:573–80, 2008.

Ayache N, Boumediene, K, Mathy-Hartert M, Reginster JY, Henrotin Y, Pujol JP. “Expression of TGF- β s and their receptors is differentially modulated by reactive oxygen species and nitric oxide in human articular chondrocytes.” *Osteoarthritis Cartilage* 10/ 344-52, 2002.

Bhattacharya M, Babwah AV, Ferguson SS. Small GTP-binding protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans.* 32:1040-4, 2004.

Baud M, Karin V. “Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives.” *Trends Cell Biol* 11: 372-77, 2001.

Benito MJ, Murphy E, Murphy EP, van den Berg WB, FitzGerald O, Bresnihan B. “Increased synovial tissue NF-kappa B1 expression at sites adjacent to the cartilage-pannus junction in rheumatoid arthritis.” *Arthritis Rheum.* 50:1781-7, 2004.

Blaney Davidson EN, Vitters EL, van Beuningen, HM, van de Loo FA, van den Berg WB, van der Kraan PM. “Resemblance of Osteophytes in Experimental Osteoarthritis to Transforming Growth Factor beta-Induced Osteophytes.” *Arthritis Rheum* 56/ 4065–73, 2007.

Blaney Davidson EN, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. “Expression of transforming growth factor- β (TGF β) and the TGF β signalling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation.” *Ann Rheumc Dis* 65:1414-21, 2006.

Bobacz K, Sunk IG, Hofstaetter JG, Amoyo L, Toma CD, Akira S, Weichhart T, Saemann M, Smolen JS. “Toll-like receptors and chondrocytes: The lipopolysaccharide-induced decrease in cartilage matrix synthesis is dependent on the presence of toll-like receptor 4 and antagonized by bone morphogenetic protein 7.” *Arthritis Rheum* 56:1880-93, 2007.

Boileau C, Amiable N, Martel-Pelletier J, Fahmi H, Duval N, Pelletier JP. “Activation of proteinase-activated receptor 2 in human osteoarthritic cartilage upregulates catabolic and proinflammatory pathways capable of inducing cartilage degradation: a basic science study.” *Arthritis Res Ther.* 9: R121, 2007.

Boileau C, Martel-Pelletier J, Moldovan F, Jouzeau JY, Netter P, Manning PT, Pelletier JP. “The in situ up-regulation of chondrocyte interleukin-1-converting enzyme and interleukin-18 levels in experimental osteoarthritis is mediated by nitric oxide.” *Arthritis Rheum* 46: 2637-47, 2002.

Boileau C, Tat SK, Pelletier J-P, Cheng S, Martel-Pelletier J. "Diacerein inhibits the synthesis of resorptive enzymes and reduces osteoclastic differentiation/survival in osteoarthritic subchondral bone: a possible mechanism for a protective effect against subchondral bone remodeling" *Arthritis Res Ther.* 10: R71, 2008

Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, Huber CM, Guzman RE, Juneau PL, Schrier DJ, Kilgore KS. "Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis." *Osteoarthritis Cartilage* 11: 821–30., 2003.

Bove SE, Laemont KD, Brooker RM, Osborn MN, Sanchez BM, Guzman RE, Hook KE, Juneau PL, Connor JR, Kilgore KS. "Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia." *Osteoarthritis Cartilage* 14:1041-8, 2006.

Brandt KD, Smith G, Kang SY, Myers S, O'Connor B, Albrecht M. "Effects of diacerhein in an accelerated canine model of osteoarthritis." *Osteoarthritis Cartilage.* 5:438-49., 1997.

Brown KD, Claudio E, Siebenlist, U. " The roles of the classical and alternative nuclear factor- κ B pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* 10:212, 2008.

Burke JP, Watson RW, Murphy M, Docherty NG, Coffey JC, O'Connell PR. "Simvastatin impairs smad-3 phosphorylation and modulates transforming growth factor beta1-mediated activation of intestinal fibroblasts." *Br J Surg.* 96:541-51., 2009.

Cake MA, Read RA, Guillou B, Ghosh P. "Modification of articular cartilage and subchondral bone pathology in an ovine meniscectomy model of osteoarthritis by avocado and soya unsaponifiables (ASU)." *Osteoarthritis Cartilage* 8: 404-11, 2000.

Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Tardif G, Mineau F, Geng C, Pelletier JP. "Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression." *Arthritis Rheum.* 39:1535-44, 1996.

Caterson B, Flannery CR, Hughes CE, Little CB. "Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism." *Matrix Biol* 19: 333-44, 2000.

Cesare SB, Abramson PE. "Pathogenesis of Osteoarthritis." In: Harris DE, Budd RC, Firestein GS. *Kelley's textbook of Rheumatology*, 7 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.

Chandrasekhar S, Harvey, A.K. "Transforming growth factor- β is a potent inhibitor of IL-1 induced protease activity and cartilage proteoglycan degradation." *Bioch Biophys Res Com* 157:1352-59, 1988.

Chen H, Ikeda U, Shimpo M, Ikeda M, Minota S, Shimada K. "Fluvastatin upregulates inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells." *Hypertension.* 36:923-8., 2000.

Chen LX, Lin L, Wang HJ, Wei XL, Fu X, Zhang JY, Yu CL. "Suppression of early experimental osteoarthritis by in vivo delivery of the adenoviral vector-mediated NF-kBp65-specific siRNA." *Osteoarthritis Cartilage* 16:174-84, 2008.

Cheung HS, Halverson PB, McCarty DJ. "Release of collagenase, neutral protease, and prostaglandins from cultured mammalian synovial cells by hydroxyapatite and calcium pyrophosphate dihydrate crystals." *Arthritis Rheum* 24: 1338-44, 1981.

Chockalingam PS, Zeng W, Morris EA, Flannery CR. "Release of hyaluronan and hyaladherins (aggrecan G1 domain and link proteins) from articular cartilage exposed to

ADAMTS-4 (aggrecanase 1) or ADAMTS-5 (aggrecanase 2),” *Arthritis Rheum* 50: 2839–48, 2004.

Clements KM, Price JS, Chambers MG, Visco DM, Poole AR, Mason RM. “Gene deletion of either interleukin-1, interleukin-1-converting enzyme, inducible nitric oxide synthase, or stromelysin 1 accelerates the development of knee osteoarthritis in mice after surgical transection of the medial collateral ligament and partial m.” *Arthritis Rheum* 48:3452-63, 2003.

Combe MJ, Bramwell R, Field S. “The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats?” *Neurosc Lett* 370: 236–40, 2004.

Cooper C. “Osteoarthritis and related conditions.” In: Dieppe PA, Klippel JH: *Rheumatology* 2ed. Londres: Mosby, 1998.

Davis MA, Ettinger WH, Neuhaus JM, Cho SA, Hauck WW. “The association of knee injury and obesity with unilateral and bilateral osteoarthritis of the knee.” *Am J Epidemiol* 130:278-88.

Desjardins F, Sekkali B, Verreth W, Pelat M, De Keyzer D, Mertens A, Smith G, Herregods MC, Holvoet P, Balligand JL. “Rosuvastatin increases vascular endothelial PPAR expression and corrects blood pressure variability in obese dyslipidaemic mice.” *Euro Heart J* 29:128-37, 2008.

Dieppe, PA. “Osteoarthritis and related disorders. introduction and history.” In: Dieppe PA, Klippel JH: *Rheumatology* 2ed. Londres: Mosby, 1998.

Dieppe PA, Lim K. “Osteoarthritis and related disorders. Clinical features and diagnostic problems.” In: Dieppe PA, Klippel JH: *Rheumatology* 2ed. Londres: Mosby, 1998.

Dieppe PA, Lohmander LS. "Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis." *Lancet*. 365:965-73, 2005.

Dilligan NN, Barry AJ, Abene MF. "Hip and Knee pain." In: Harris DE, Budd RC, Firestein GS. *Kelley's textbook of Rheumatology*, 7 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.

Dombrecht EJ, Van Offel JF, Bridts CH, Ebo DG, Seynhaeve V, Schuerwegh AJ, Stevens WJ, De Clerck LS. "Influence of simvastatin on the production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide by activated human chondrocytes." *Clin Exp Rheumatol*. 25:534-9, 2007.

Doré S, Abribat T, Rousseau N, Brazeau P, Tardif G, DiBattista JA, Cloutier JM, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. "Increased insulin-like growth factor 1 production by human osteoarthritic chondrocytes is not dependent on growth hormone action." *Arthritis Rheum* 38: 413 - 19, 1995.

Dunne LAJ, O'Nei AI. "The Interleukin-1 Receptor/Toll-Like Receptor Superfamily: Signal Transduction During Inflammation and Host Defense." *Sci. STKE*, 171: re3, 2003.

Ea HK, Uzan B, Rey C, Lioté F. "Octacalcium phosphate crystals directly stimulate expression of inducible nitric oxide synthase through p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in articular chondrocytes." *Arthritis Res Ther* 7: R915–R926, 2005.

Ehrlich MG, Mankin HJ, Jones H, Grossman A, Crispen C, Ancona D. "Biochemical confirmation of an experimental osteoarthritis model." *J Bone Joint Surg Am*. 57:392-6., 1975.

Englund M, Lohmander LS. "Risk factors for symptomatic knee osteoarthritis fifteen to twenty-two years after meniscectomy." *Arthritis Rheum*. 50:2811-9, 2004.

Englund M, Roos EM, Lohmander LS. "Impact of type of meniscal tear on radiographic and symptomatic knee osteoarthritis: a sixteen-year followup of meniscectomy with matched controls." *Arthritis Rheum.* 48:2178-87, 2003.

Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Lüscher TF. "Statin Prevents Tissue Factor Expression in Human Endothelial Cells." *Circulation.* 105:1756-1759, 2002.

Eubanks JD, Lee MJ, Cassinelli E, Ahn NU. "Prevalence of Lumbar Facet Arthrosis and Its Relationship to Age, Sex, and Race: An Anatomic Study of Cadaveric Specimens." *Spine* 32: 2058-62, 2007.

Fan Z, Bau B, Yang H, Aigner T. "IL-1 beta induction of IL-6 and LIF in normal articular human chondrocytes involves the ERK, p38 and NFkappaB signaling pathways." *Cytokine* 28:17-24, 2004.

Fan Z, Söder S, Oehler S, Fundel K, Aigner T. "Activation of Interleukin-1 Signaling Cascades in Normal and Osteoarthritic Articular Cartilage." *Am J Pathol.* 171: 938–946., 2007.

Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. "The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology." *Biorheology.* 39:237-46., 2002.

Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas T, Kidd B, Bevan S, Winter J. "Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee." *Pain* 112: 83–93, 2004.

Gebhard PM, Söder S, Bau B, Aigner T. "Down-regulation of the GTPase RhoB might be involved in the pre-apoptotic phenotype of osteoarthritic chondrocytes." *Front Biosci.* 9:827-33., 2004.

Gelber AC, Hochberg MC, Mead NA, Wang N-Y, Wigley FM, Klag MJ. "Joint Injury in Young Adults and Risk for Subsequent Knee and Hip Osteoarthritis." *Ann Int Med* 133: 321-28, 2000.

Geng Y, Valbracht J, Lotz M. "Selective Activation of the Mitogen-activated Protein Kinase Subgroups c-Jun NH2 Terminal Kinase and p38 by IL-1 and TNF in Human Articular Chondrocytes." *J Clin Invest* 98:2245-30, 1996.

Gerlag PP, Tak D. "Synovial biopsy." *Best Pract Res Clinl Rheumatol.* 19: 387-400, 2005.

Germershausen JI, Hunt VM, Bostedor RG, Bailey PJ, Karkas JD, Alberts AW. "Tissue selectivity of the cholesterol-lowering agents lovastatin, simvastatin and pravastatin in rats in vivo." *Biochem Biophys Res Commun.* 158:667-75, 1989.

Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Peluso D, Kanki K, Yang Z, Majumdar MK, Morris EA. "Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis." *Nature* 434:644-6, 2005.

Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, Kimura T, Krane SM. "Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes." *J Clin Invest.* 82: 2026-37, 1988.

Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, Arbisser JL, Apperley JF. "Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes." *J Clin Invest.* 94: 2307-16., 1994.

Goldring MB, Goldring SR. "Biology of the normal joint." In: Harris DE, Budd RC, Firestein GS. *Kelley's textbook of Rheumatology*, 7 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.

Goldring MB. "Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases." *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20:1003-25, 2006.

Gouze JN, Bordji K, Gulberti S, Terlain B, Netter P, Magdalou J, Fournel-Gigleux S, Ouzzine M. "Interleukin-1 down-regulates the expression of glucuronosyltransferase I, a key enzyme priming glycosaminoglycan biosynthesis: Influence of glucosamine on interleukin-1-mediated effects in rat chondrocytes." *Arthritis Rheum* 44: 351-60, 2001.

Graham JA, Fairclough GP. "The Knee." In: Dieppe JH, Klippel PA.. *Rheumatology* 2ed. Londres: Mosby, 1998.

Gupta EP, Lyons TJ, Hoyland JA, Lawton DM, Freemont AJ. "New histological observations in spontaneously developing osteoarthritis in the STR/ORT mouse questioning its acceptability as a model of human osteoarthritis." *Int J Exp Pathol.* 74:627-34, 1993.

Haara MM, Manninen P, Kröger H, Arokoski JP, Kärkkäinen A, Knekt P, Aromaa A, Heliövaara M. "Osteoarthritis of finger joints in Finns aged 30 or over:prevalence, determinants, and association with mortality." *Ann Rheum Dis* 62:151–58, 2003.

Handel ML, McMorrow LB, Gravallesse EM. "Nuclear factor-kappa B in rheumatoid synovium. Localization of p50 and p65." *Arthritis Rheum.* 38:1762-70., 1995.

Hardingham TE, Fosang AJ. "Proteoglycans: many forms and many functions." *FASEB J.* 6:861–70 , 1992.

Hardy MM, Seibert K, Manning PT, Currie MG, Woerner BM, Edwards D, Koki A, Tripp CS. "Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants." *Arthritis Rheum* 46: 1789-803, 2002.

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. "A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia." *Pain*. 32:77- 88., 1988.

Harper CR, Jacobson, TA. "The broad spectrum of statin myopathy: from myalgia to rhabdomyolysis." *Curr Opin Lipidology* 48:401-8, 2007.

Hart DJ, Cronin C, Daniels M, Worthy T, Doyle DV, Spector TD. "The Relationship of Bone Density and Fracture to Incident and Progressive Radiographic Osteoarthritis of the Knee." *Arthritis Rheum* 46: 92-9, 2002.

Hart DJ, Doyle DV, Spector TD. "Incidence and risk factors for radiographic knee osteoarthritis in middle-aged women: the Chingford Study." *Arthritis Rheum* 42:17-24, 1999.

Hart DJ, Spector TD. "The relationship of obesity, fat distribution and osteoarthritis in women in the general population: the Chingford Study." *J Rheumatol*. 20:331-5, 1993.

Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M. "Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis." *Arthritis Rheum* 41:1632 - 8 , 2004.

Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M. "Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis." *Arthritis Rheum* 41: 1266-74, 1988.

Haslinger B, Kleemann R, Toet KH, Kooistra T. "Simvastatin suppresses tissue factor expression and increases fibrinolytic activity in tumor necrosis factor alfa-activated human peritoneal mesothelial cells." *Kidney Int* 63: 2065–74, 2003.

Hasselbacher, P. "Structure of the synovial membrane." *Clin Rheum Dis Volume* 7: 57-69, 1981.

Hasselbacher, P. "Joint Physiology." In: Dieppe PA, Klippel DH. *Rheumatology*. Londres: Mosby, 1998.

Hayami T, Funaki H, Yaoeda K, Mitui K, Yamagiwa H, Tokunaga K, Hatano H, Kondo J, Hiraki Y, Yamamoto T, Duong le T, Endo N. "Expression of the Cartilage Derived Anti-Angiogenic Factor Chondromodulin-I Decreases in the Early Stage of Experimental Osteoarthritis." *J Rheumatol* 30:2207–17, 2003.

Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, Wesolowski GA, Rodan GA, Duong le T. "Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis." *Bone* 38: 234–43, 2006.

Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, Gill SE, Ganesan A, Wilson D, Walsh DA. "Inflammation and Angiogenesis in Osteoarthritis." *Arthritis Rheum* 48: 2173–7, 2003.

Hernández-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Martín-Ventura JL, Mas S, Blanco-Colio LM, Aparicio C, Ortega L, Gómez-Gerique J, Vivanco F, Egido J. "Simvastatin reduces NF- κ B activity in peripheral mononuclear and in plaque cells of rabbit atheroma more markedly than lipid lowering diet." *Cardiovascular Research* 57:168-77, 2003.

Honorati MC, Bovara M, Cattini L, Piacentini A, Facchini A. "Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis." *Osteoarthritis Cartilage*. 10:799-807, 2002.

Honorati MC, Meliconi R, Pulsatelli L, Canè S, Frizziero L, Facchini A. "High in vivo expression of interleukin-17 receptor in synovial endothelial cells and chondrocytes from arthritis patients." *Rheumatology* 40: 522-7, 2001.

Hubley-Kozey CL, Deluzio KJ, Landry SC, McNutt JS, Stanish WD. "Neuromuscular alterations during walking in persons with moderate knee osteoarthritis." *J Electromyogr Kinesiol.* 16:365-78. 2006

Huebner JL, Kraus VB. "Assessment of the utility of biomarkers of osteoarthritis in the guinea pig." *Osteoarthritis Cartilage.* 14:923-30, 2006.

Hughes A, Rogers MJ, Idris AI, Crockett JC. "A comparison between the effects of hydrophobic and hydrophilic statins on osteoclast function in vitro and ovariectomy-induced bone loss in vivo." *Calcif Tissue Int.* 81:403-13, 2007.

Hunter DJ, McDougall JJ, Keefe FJ. "The symptoms of osteoarthritis and the genesis of pain." *Rheum Dis Clin North Am.* 34:623-43, 2008.

Hurley MV, Newham DJ." The influence of arthrogenous muscle inhibition on quadriceps rehabilitation of patients with early, unilateral osteoarthritic knees." *Br J Rheumatol.* 32:127-3, 1993.

Hwa SY, Burkhardt D, Little C, Ghosh P. "The effects of orally administered diacerein on cartilage and subchondral bone in an ovine model of osteoarthritis." *J Rheumatol.* 28: 825-34, 2001.

Itoh Y, Kimoto K, Imaizumi M, Nakatsuka K. "Inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway suppresses the expression of type I collagen induced by TGF- β 2 in human retinal pigment epithelial cells." *Exp Eye Res* 84: 464-72, 2007.

Iwanaga H, Matsumoto T, Enomoto H, Okano K, Hishikawa Y, Shindo H, Koji T. "Enhanced expression of insulin-like growth factor-binding proteins in human osteoarthritic cartilage detected by immunohistochemistry and in situ hybridization." *Osteoarthritis Cartilage* 13: 439-48, 2005.

Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K. "Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint." *Arch Histol Cytol* 63:17-31, 2000.

Janusz MJ, Bendele AM, Brown KK, Taiwo YO, Hsieh L, Heitmeyer SA. "Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: Inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor." *Osteoarthritis Cartilage* 10: 785–91, 2002.

Johnson KA, Rose DM, Terkeltaub RA. "Factor XIIIa mobilizes transglutaminase 2 to induce chondrocyte hypertrophic differentiation." *J Cell Sci.* 2008 July 1; 121(Pt 13): 2256-64, 2008.

Kagami SI, Owada T, Kanari H, Saito Y, Suto A, Ikeda K, Hirose K, Watanabe N, Iwamoto I, Nakajima H. "Protein geranylgeranylation regulates the balance between Th17 cells and Foxp3+ regulatory T cells." *Int Immunol.* [Epub ahead of print], 2009.

Kaiser M, Haag J, Söder S, Bau B, Aigner T. "Bone morphogenetic protein and transforming growth factor inhibitory Smads 6 and 7 are expressed in human adult normal and osteoarthritic cartilage in vivo and are differentially regulated in vitro by interleukin-1." *Arthritis Rheum* 50: 3535-40, 2004.

Kalish DA. "Chemical model of osteoarthritis--a pharmacological evaluation." *J Rheumatol. Spec No:130-1*, 1987.

Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, Uchida M, Ogata N, Seichi A, Nakamura K, Kawaguchi H. "Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability." *Osteoarthritis Cartilage* 13: 632-41, 2005.

Kean WF, Kean R, Buchanan WW. "Osteoarthritis: symptoms, signs and source of pain." *Inflammopharmacology.* 12:3-31, 2004.

Kessler S, Stöve J, Puhl W, Stürmer T. “First carpometacarpal and interphalangeal osteoarthritis of the hand in patients with advanced hip or knee OA. Are there differences in the aetiology?” *Clin Rheumatol*. 22:409-13, 2003.

Kim HA, Cho ML, Choi HY, Yoon CS, Jhun JY, Oh HJ, Kim HY. “The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes.” *Arthritis Rheum* 54: 2152-63, 2006.

Kim HA, Lee YJ, Seong SC, Choe KW, Song YW. “Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis.” *J Rheumatol* 27: 455-62, 2000.

Kirsch T, Nah HD, Shapiro IM, Pacifici M. “Regulated Production of Mineralization-competent Matrix Vesicles in Hypertrophic Chondrocytes.” *J Cell Biol*. 137: 1149–60, 1997.

Kirsch T, Swoboda B, Nah H. “Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage.” *Osteoarthritis Cartilage*. 8:294-302, 2000.

Kobayashi T, Notoya K, Naito T, Unno S, Nakamura A, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. “Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor agonist, reduces the progression of experimental osteoarthritis in guinea pigs.” *Arthritis Rheum* 52: 479-87, 2005.

Kojima F, Naraba H, Miyamoto S, Beppu M, Aoki H, Kawai S. “Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis.” *Arthritis Res Ther* 6:R355-65, 2004.

Kopp S, Meijersjo, C, Clemensson, E. “Induction of osteoarthrosis in the guinea pig knee by papain.” *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 55:259–66, 1983.

Kuijk LM, Beekman JM, Koster J, Waterham HR, Frenkel J, Coffey PJ. "HMG-CoA reductase inhibition induces IL-1 β release through Rac1/PI3K/PKB-dependent caspase-1 activation." *Blood*, 112:3563-73., 2008.

Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F. "Statins as a newly recognized type of immunomodulator." *Nat Med*. 6:1399-402., 2000.

LaVallie ER, Chockalingam PS, Collins-Racie LA, Freeman BA, Keohan CC, Leitges M, Dorner AJ, Morris EA, Majumdar MK, Arai M. "Protein Kinase C ζ Is Up-regulated in Osteoarthritic Cartilage and Is Required for Activation of NF- κ B by Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 in Articular Chondrocytes." *J. Biol. Chem.*, 281:24124-37, 2006.

Lazzerini PE, Capecchi PL, Nerucci F, Fioravanti A, Chellini F, Piccini M, Bisogno S, Marcolongo R, Laghi Pasini F. "Simvastatin reduces MMP-3 level in interleukin 1 β stimulated human chondrocyte culture." *Ann Rheum Dis* 63:867–9, 2004.

Lazzerini PE, Lorenzini S, Selvi E, Capecchi PL, Chindamo D, Bisogno S, Ghittoni R, Natale MR, Caporali F, Giuntini S, Marcolongo R, Galeazzi M, Laghi-Pasini F. "Simvastatin inhibits cytokine production and nuclear factor- κ B activation in interleukin 1 β -stimulated synoviocytes from rheumatoid arthritis patients." *Clin Exp Rheumatol*. 25:696-700, 2007.

Leung BP, Sattar N, Crilly A, Prach M, McCarey DW, Payne H, Madhok R, Campbell C, Gracie JA, Liew FY, McInnes IB. "A Novel Anti-Inflammatory Role for Simvastatin in Inflammatory Arthritis." *J Immuno* 170: 1524-30, 2003.

Li X, Ellman M, Muddasani P, Wang JH, Cs-Szabo G, van Wijnen AJ, Im HJ. "Prostaglandin E2 and its cognate EP receptors control human adult articular cartilage homeostasis and are linked to the pathophysiology of osteoarthritis." *Arthritis Rheum* 60: 513 - 23, 2009.

- Li M, Li Z, Sun X. "Statins suppress MMP2 secretion via inactivation of RhoA/ROCK pathway in pulmonary vascular smooth muscles cells." *Eur J Pharmacol* 591: 219-23, 2008.
- Lippiello L, Woodward J, Karpman R, Hammad TA. "In Vivo Chondroprotection and Metabolic Synergy of Glucosamine and Chondroitin Sulfate." *Clin Orthop* 381:229-40, 2000.
- Lorenz H, Wenz W, Ivancic M, Steck E, Richter W. "Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading." *Arthritis Res Ther.* 7 R156–65, 2005.
- Lubbert E. IL-17/Th17 targeting: On the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine* 41: 84-91, 2008.
- Maccoux LJ, Salway F, Day PJ, Clements DN. "Expression profiling of select cytokines in canine osteoarthritis tissues." *Vet Immunol Immunopathol.* 118:59-67, 2007.
- Maetzel A, Li LC, Pencharz J, Tomlinson G, Bombardier C. "The economic burden associated with osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and hypertension: a comparative study." *Ann Rheum Dis* 63:395-401, 2004.
- Maher BM, Dhonnchu TN, Burke JP, Soo A, Wood AE, Watson RW. "Statins alter neutrophil migration by modulating cellular Rho activity--a potential mechanism for statins-mediated pleiotropic effects?" *J Leukoc Biol.* 85:186-93, 2009.
- Major ML, Cheung HS, Misra RP. "Basic Calcium Phosphate Crystals Activate c-fos Expression Through a Ras/ERK Dependent Signaling Mechanism." *Biochem Biophys Res Commun.* 355: 654–60, 2007.

Mandey SH, Kuijk LM, Frenkel J, Waterham HR. "A role for geranylgeranylation in interleukin-1 secretion." *Arthritis Rheum* 54: 3690-5, 2006.

Mankin HJ, Johnson ME, Lippiello L. "Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data." *J Bone Joint Surg Am.* 63:131-9, 1981.

Mapp PI, Avery PS, McWilliams DF, Bowyer J, Day C, Moores S, Webster R, Walsh DA. "Angiogenesis in two animal models of osteoarthritis." *Osteoarthritis Cartilage.* 16:61-9, 2008.

Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ. "Cartilage in normal and osteoarthritis conditions." *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 22:351-84, 2008.

Martel-Pelletier J, Mineau F, Jovanovic D, Di Battista JA, Pelletier JP. "Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB together regulate interleukin-17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes: possible role of transactivating factor mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase" *Arthritis Rheum* 42: 2399–409, 1999.

Martel-Pelletier J, Mineau F, Jolicoeur FC, Cloutier JM, Pelletier JP. "In vitro effects of diacerhein and rehin on IL-1 and TNF- α systems in human osteoarthritic tissues". *J Rheumatol.* 25:753–62, 1998.

Martin G, Andriamanalijaona R, Grässel S, Dreier R, Mathy-Hartert M, Bogdanowicz P, Boumédiène K, Henrotin Y, Bruckner P, Pujol JP. "Effect of Hypoxia and Reoxygenation on Gene Expression and Response to Interleukin-1 in Cultured Articular Chondrocytes." *Arthritis Rheum* 50: 3549–60, 2005.

Martin G, Duez H, Blanquart C, Berezowski V, Poulain P, Fruchart JC, Najib-Fruchart J, Glineur C, Staels B. "Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPAR α and induces HDL apoA-I." *J Clin Invest.* 107:1423-32, 2001.

Martinon F, Mayor A, Tschopp J "The Inflammasomes: Guardians of the Body" *Ann Rev Immunol* 27: 229-65, 2009.

Mason RM, Chambers MG, Flannelly J, Gaffen JD, Dudhia J, Bayliss MT. "The STR/ort mouse and its use as a model of osteoarthritis." *Osteoarthritis Cartilage* 9: 85–91, 2001.

Mathy-Hartert M, Burton S, Deby-Dupont G, Devel P, Reginster JY, Henrotin Y. "Influence of oxygen tension on nitric oxide and prostaglandin E2 synthesis by bovine chondrocytes." *Osteoarthritis Cartilage.* 13:74-9, 2005.

Mazzuca SA, Brandt KD, German NC, Buckwalter KA, Lane KA, Katz BP. "Development of radiographic changes of osteoarthritis in the Chingford knee reflects progression of disease or non-standardised positioning of the joint rather than incident disease." *Ann Rheum Dis* 62:1061-5, 2003.

McDevitt C, Gilbertson E, Muir H. "An experimental model of osteoarthritis; early morphological and biochemical changes." *J Bone Joint Surg Br.* 59:24-35, 1977.

Mendes AF, Caramona MM, Carvalho AP, Lopes MC. "Role of Mitogen-Activated Protein Kinases and Tyrosine Kinases on IL-1-Induced NF- κ B Activation and iNOS Expression in Bovine Articular Chondrocytes." *Nitric Oxide.* 6:35-44, 2002.

Mikael R, Rozen LG. "Homocysteine modulates the effect of simvastatin on expression of ApoA-I and NF-B/iNOS." *Cardiovascular Research* 80:151-8, 2008.

Mistry D, Oue Y, Chambers MG, Kayser MV, Mason RM. "Chondrocyte death during murine osteoarthritis." *Osteoarthritis Cartilage*. 12:131-41, 2004.

Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. "Divergence and convergence of TGF-/BMP signaling." *J Cell Physiol*. 187:265-76, 2001.

Montero MT, Matilla J, Gómez-Mampaso E, Lasunción MA. "Geranylgeraniol Regulates Negatively Caspase-1 Autoprocessing: Implication in the Th1 Response against Mycobacterium tuberculosis." *J Immunol* 173: 4936- 44, 2004.

Moreau M, Boileau C, Martel-Pelletier J, Brunet J, Laufer S, Pelletier JP. "Licofelone reduces progression of structural changes in a canine model of osteoarthritis under curative conditions: effect on protease expression and activity." *J Rheumatol*. 33:1176-83, 2006.

Murphy DM, Forrest IA, Corris PA, Johnson GE, Small T, Jones D, Fisher AJ, Egan JJ, Cawston TE, Ward C, Lordan JL. "Simvastatin attenuates release of neutrophilic and remodeling factors from primary bronchial epithelial cells derived from stable lung transplant recipients." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L592-9, 2008.

Novakofski K, Boehm A, Fortier L. "The small GTPase Rho mediates articular chondrocyte phenotype and morphology in response to interleukin-1alpha and insulin-like growth factor-I." *J Orthop Res*. 27:58-64, 2009.

O'Connell JX. "Pathology of the Synovium." *Am J Clin Pathol* 114:773-84, 2000.

Ou XM, Feng YL, Wen FQ, Huang XY, Xiao J, Wang K, Wang T. "Simvastatin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice." *Chin Med J* 121: 1821- 9, 2008.

Papachristou DJ, Papadakou E, Basdra EK, Baltopoulos P, Panagiotopoulos E, Papavassiliou AG. "Involvement of the p38 MAPK–NF-κB Signal Transduction Pathway and COX-2 in the Pathobiology of Meniscus Degeneration in Humans." *Mol Med.* 14: 160–6., 2008.

Park HJ, Kong D, Iruela-Arispe L, Begley U, Tang D, Galper JB. "3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors interfere with angiogenesis by inhibiting the geranylgeranylation of RhoA." *Circ Res.* 91:143-50, 2002.

Patwari P, Gao G, Lee JH, Grodzinsky AJ, Sandy JD. "Analysis of ADAMTS4 and MT4-MMP indicates that both are involved in aggrecanolysis in interleukin-1-treated bovine cartilage." *Osteoarthritis Cartilage* 13: 269-77, 2005.

Paumelle R, Blanquart C, Briand O, Barbier O, Duhem C, Woerly G, Percevault F, Fruchart JC, Dombrowicz D, Glineur C, Staels B. "Acute antiinflammatory properties of statins involve peroxisome proliferator-activated receptor-alpha via inhibition of the protein kinase C signaling pathway." *Circ Res.* 98:361-9, 2006.

Pelletier JP, Fernandes JC, Brunet J, Moldovan F, Schrier D, Flory C, Martel-Pelletier J. "In vivo selective inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 in rabbit experimental osteoarthritis is associated with a reduction in the development of structural changes." *Arthritis Rheum* 48: 1582 - 93, 2003.

Pelletier JP, Fernandes JC, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J. "Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase." *J Rheumatol.* 28:2509-19, 2001.

Pelletier JP, Jovanovic DV, Lascau-Coman V, Fernandes JC, Manning PT, Connor JR, Currie MG, Martel-Pelletier J. "Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces

progression of experimental osteoarthritis in vivo: Possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level.” *Arthritis Rheum* 43: 1290 - 9, 2001.

Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. “Osteoarthritis, an inflammatory disease: Potential implication for the selection of new therapeutic targets.” *Arthritis Rheum* 44: 1237-47, 2001.

Pelletier JP, McCollum R, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. “Synthesis of metalloproteases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process.” *J Rheumatol* 22: 109-14, 1995.

Peterson IF. “Osteoarthritis of the peripheral joints.” *Best Pract Res Clin Rheumatol* 16: 741-60, 2002.

Pombo-Suarez M, Castaño-Oreja MT, Calaza M, Gomez-Reino J, Gonzalez A. “Differential Up-Regulation of the Three TGF- β Isoforms in Human Osteoarthritic Cartilage.” *Ann Rheum Dis*. 68:568-71, 2009.

Pritchard S, Votta BJ, Kumar S, Guilak F. “Interleukin-1 inhibits osmotically induced calcium signaling and volume regulation in articular chondrocytes.” *Osteoarthritis Cartilage*. 16:1466-73., 2008.

Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA. “Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging.” *Osteoarthritis Cartilage* 14: 13-29, 2006.

Pujol JP, Chadjichristos C, Legendre F, Bauge C, Beauchef G, Andriamanalijaona R, Galera P, Boumediene K. “Interleukin-1 and transforming growth factor-beta 1 as crucial factors in osteoarthritic cartilage metabolism.” *Connect Tissue Res*. 49:293-7, 2008.

Pullig O, Weseloh G, Ronneberger D, Käkönen S, Swoboda B. “Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone.” *Calcif Tissue Int.* 67:230-40, 2000.

Rezende MU, Gurgel HM, Vilaça Junior PR, Kuroba RK, Lopes AS, Phillipi RZ, Hernandez AJ. “Diacerhein versus glucosamine in a rat model of osteoarthritis.” *Clinics* 61:461-6, 2006.

Rockel JS, Bernier SM, Leask, A. “Egr-1 inhibits the expression of extracellular matrix genes in chondrocytes by TNF α -induced MEK/ERK signalling.” *Arthritis Res Ther* 11:R8, 2009.

Roman-Blas JA, Stokes DG, Jimenez SA. “Modulation of TGF-beta signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes.” *Osteoarthritis Cartilage.* 15: 1367–77, 2007.

Säämänen AK, Salminen HJ, Dean PB, De Crombrughe B, Vuorio EI, Metsäranta MP. “Osteoarthritis-like lesions in transgenic mice harboring a small deletion mutation in type II collagen gene.” *Osteoarthritis Cartilage.* 8:248-57, 2000.

Sabatini M, Lesur C, Thomas M, Chomel A, Anract P, de Nanteuil G, Pastoureau P. “Effect of inhibition of matrix metalloproteinases on cartilage loss in vitro and in a guinea pig model of osteoarthritis.” *Arthritis Rheum* 52: 171 - 180, 2005.

Sachdev D, Yee D. “Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy.” *Mol Cancer Ther.* 6:1-12, 2007.

Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. “Interleukin-1 β -converting enzyme/caspase-1 in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of interleukin-1 β and interleukin-18.” *Arthritis Rheum* 42: 1577–87, 1999.

Sanchez C, Deberg MA, Piccardi N, Msika P, Reginster JY, Henrotin YE. "Osteoblasts from the sclerotic subchondral bone downregulate aggrecan but upregulate metalloproteinases expression by chondrocytes. This effect is mimicked by interleukin-6, -1 β and oncostatin M pre-treated non-sclerotic osteoblasts." *Osteoarthritis Cartilage*. 13:979-87., 2005.

Sanchez C, Deberg MA, Piccardi N, Msika P, Reginster JY, Henrotin YE.. "Subchondral bone osteoblasts induce phenotypic changes in human osteoarthritic chondrocytes." *Osteoarthritis Cartilage*. 13:988-97, 2005.

Santodomingo-Garzón T, Cunha TM, Verri WA Jr, Valério DA, Parada CA, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. "Atorvastatin inhibits inflammatory hypernociception." *British J Pharmacol* 149: 14–22, 2006.

Scharstuhl A, Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. "Inhibition of Endogenous TGF- During Experimental Osteoarthritis Prevents Osteophyte Formation and Impairs Cartilage Repair." *J Immuno* 169: 507-14, 2002.

Scharstuhl A, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. "Reduction of osteophyte formation and synovial thickening by adenoviral overexpression of transforming growth factor /bone morphogenetic protein inhibitors during experimental osteoarthritis." *Arthritis Rheum*. 48:3442-51, 2003.

Schett G, Zwerina J, Firestein G "The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in rheumatoid arthritis" *Ann Rheum Dis* 67:909-16, 2008.

Serra R, Johnson M, Filvaroff EH, LaBorde J, Sheehan DM, Derynck R, Moses HL. "Expression of a Truncated, Kinase-Defective TGF- β Type II Receptor in Mouse Skeletal Tissue Promotes Terminal Chondrocyte Differentiation and Osteoarthritis." *J Cell Biol*. 139: 541–52, 1997.

Shahrara S, Huang Q, Mandelin AM 2nd, Pope RM. "TH-17 cells in rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther.* 10: R93, 2008.

Shirinsky IV, Zheltova OI, Solovyova NY, Kozlov VA, Shirinsky VS. "Changes in disease activity, cytokine production, and proliferation of peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis after simvastatin treatment." *Scand J Rheumatol.* 38:23-7, 2009.

Shitara Y, Sugiyama Y. "Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme function." *Pharmacol therapeutics* 112: 71-105, 2006.

Sidiropoulos PI, Goulielmos G, Voloudakis GK, Petraki E, Boumpas DT. "Inflammasomes and rheumatic diseases: evolving concepts" *Ann Rheum Dis* 67:1382-89, 2008.

Silbermann, M. "Experimentally induced osteoarthritis in the temporomandibular joint of the mouse." *Acta Anat (Basel).* 96:9-24, 1978.

Simmonds M, Foxwell RE. "NFkappa-B and its relevance to arthritis and inflammation." *Rheumatology* 47:584-90, 2008.

Smith GN Jr, Myers SL, Brandt KD, Mickler EA, Albrecht ME. "Diacerhein treatment reduces the severity of osteoarthritis in the canine cruciate-deficiency model of osteoarthritis." *Arthritis Rheum* 42: 545-54, 1999.

Smith JO, Oreffo RO, Clarke NM, Roach HI. "Changes in the antiangiogenic properties of articular cartilage in osteoarthritis." *J Orthop Sci* 8:849-57, 2003.

Smith MD, Barg E, Weedon H, Papangelis V, Smeets T, Tak PP, Kraan M, Coleman M, Ahern MJ. "Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints." *Ann Rheum Dis.* 62:303-7, 2003.

Smith MD, Triantafillou S, Parker A, Youssef PP, Coleman M. "Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis." *J Rheumatol.* 24:365-71, 1997.

Sodha S, Ring D, Zurakowski D, Jupiter JB. "Prevalence of osteoarthrosis of the trapeziometacarpal joint." *J Bone Joint Surg Am.* 87:2614-8, 2005.

Song Y, Greve JM, Carter DR, Giori NJ. "Meniscectomy alters the dynamic deformational behavior and cumulative strain of tibial articular cartilage in knee joints subjected to cyclic loads." *Osteoarthritis Cartilage.* 16:1545-54, 2008.

Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M, Mundt S, Hassing H, Patel S, Rosa R, Hermanowski-Vosatka A, Wang PR, Zhang D, Peterson L, Detmers PA, Chao YS, Wright SD. "Simvastatin Has Anti-Inflammatory and Antiatherosclerotic Activities Independent of Plasma Cholesterol Lowering." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21:115-21, 2001.

Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D. "Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study." *BMJ* 312:940-4, 1996.

Stevens AL, Wheeler CA, Tannenbaum SR, Grodzinsky AJ. "Nitric oxide enhances aggrecan degradation by aggrecanase in response to TNF- α but not IL-1 β treatment at a post-transcriptional level in bovine cartilage explants." *Osteoarthritis Cartilage.* 16:489-97, 2008.

Sturnieks DL, Besier TF, Mills PM, Ackland TR, Maguire KF, Stachowiak GW, Podsiadlo P, Lloyd DG. "Knee joint biomechanics following arthroscopic partial meniscectomy." *J Orthop Res.* 26:1075-80, 2008.

Sukhova P, Williams GK, Libby JK. "Statins Reduce Inflammation in Atheroma of Nonhuman Primates Independent of Effects on Serum Cholesterol." *Arterioscl Throm Vasc Biol* 22:1452 , 2002.

Sutterwala FS, Ogura Y, Flavel RA. "The inflammasome in pathogen recognition and inflammation." *J Leukocyte Biol.* 82:259-64, 2007.

Tak GS, Firestein PP. "NF- κ B: a key role in inflammatory diseases." *J. Clin. Invest.* 107: 7-11, 2001.

Takai Y, Sasaki T, Matozaki, T. "Small GTP-Binding Proteins." *Physiological Rev*, 81: 153-208, 2001.

Tchetina EV, Antoniou J, Tanzer M, Zukor DJ, Poole AR. "Transforming growth factor-beta2 suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic cartilage, reduces expression of genes associated with chondrocyte hypertrophy and degradation, and increases prostaglandin E(2) production." *Am J Pathol.* 168:131-40, 2006.

Tchetina EV, Di Battista JA, Zukor DJ, Antoniou J, Poole AR. "Prostaglandin PGE2 at very low concentrations suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic articular cartilage: this involves a decrease in expression of proinflammatory genes, collagenases and COL10A1, a gene linked to chondrocyte hypert." *Arthritis Res Ther.* 9:R75, 2007.

Tchetina EV, Squires G, Poole AR. "Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions." *J Rheumatol.* 32:876-86, 2005.

Thomas B, Thirion S, Humbert L, Tan L, Goldring MB, B  r  ziat G, Berenbaum F. "Differentiation regulates interleukin-1beta-induced cyclo-oxygenase-2 in human articular

chondrocytes: role of p38 mitogen-activated protein kinase.” *Biochem J.* 362(Pt 2): 367–73, 2002.

Thomas CM, Fuller CJ, Whittles CE, Sharif M. “Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation.” *Osteoarthritis Cartilage* 15: 27-34, 2007.

Tiralloche G, Girard C, Chouinard L, Sampalis J, Moquin L, Ionescu M, Reiner A, Poole AR, Lavery S. “Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis.” *Arthritis Rheum* 52: 1118-28, 2005.

Torres L, Dunlop DD, Peterfy C, Guermazi A, Prasad P, Hayes KW, Song J, Cahue S, Chang A, Marshall M, Sharma L. “The relationship between specific tissue lesions and pain severity in persons with knee osteoarthritis.” *Osteoarthritis Cartilage* 14: 1033-40, 2006.

Tortorella MD, Malfait AM, Deccico C, Arner E,. “The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation.” *Osteoarthritis Cartilage* 9: 539–52, 2001.

Turner NA, Aley PK, Hall KT, Warburton P, Galloway S, Midgley L, O'Regan DJ, Wood IC, Ball SG, Porter KE. “Simvastatin inhibits TNF α -induced invasion of human cardiac myofibroblasts via both MMP-9-dependent and -independent mechanisms.” *J Mol Cel Cardiol* 43: 168-76, 2007.

Turner NA, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE. “Simvastatin inhibits MMP-9 secretion from human saphenous vein smooth muscle cells by inhibiting the RhoA/ROCK pathway and reducing MMP-9 mRNA levels.” *FASEB J.* 19:804-6, 2005.

Uzzan B, Cohen R, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. “Effects of statins on bone mineral density: a meta-analysis of clinical studies.” *Bone.* 40:1581-7, 2007.

van Beuningen HM, Glansbeek HL, van der Kraan PM, van den Berg WB. "Osteoarthritis-like changes in the murine knee joint resulting from intra-articular transforming growth factor-beta injections." *Osteoarthritis Cartilage* 8:25–33, 2000.

van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB. "Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint." *Lab Invest.* 71:279-90, 1994.

van den Berg, W B. "Lessons from animal models of osteoarthritis." *Curr Opin Rheumatol* 13: 452-56, 2001.

Vendruscolo LF, Pamplona FA, Takahashi RN. "Strain and sex differences in the expression of nociceptive behavior and stress-induced analgesia in rats." *Brain Research* 1030: 277– 83, 2004.

Verdier MP, Seité S, Guntzer K, Pujol JP, Boumédiène K. "Immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta isoforms and their receptors in human cartilage from normal and osteoarthritic femoral heads." *Rheumatol Int* 25:118-24, 2005.

Vickers S, Duncan CA, Chen IW, Rosegay A, Duggan DE. "Metabolic disposition studies on simvastatin, a cholesterol-lowering prodrug." *Drug Metab Dispos.* 18:138-45, 1990.

Vincent L, Chen W, Hong L, Mirshahi F, Mishal Z, Mirshahi-Khorassani T, Vannier JP, Soria J, Soria C. "Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor: contribution to its anti-angiogenic effect." *FEBS Lett.* 495:159-66, 2001.

Vincent L, Soria C, Mirshahi F, Opolon P, Mishal Z, Vannier JP, Soria J, Hong L. "Cerivastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase, inhibits endothelial cell proliferation induced by angiogenic factors in vitro and angiogenesis in in vivo models." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22:623-9, 2002.

Vonsy JL, Ghandehari J, Dickenson AH. “Differential analgesic effects of morphine and gabapentin on behavioural measures of pain and disability in a model of osteoarthritis pain in rats.” *Eur J Pain*. [Epub ahead of print], 2008.

Waiczies S, Bendix I, Zipp F. “Geranylgeranylation but Not GTP Loading Determines Rho Migratory Function in T Cells.” *J Immunol* 179: 6024-32, 2007.

Waiczies S, Bendix I, Zipp F. “Geranylgeranylation but not GTP-loading of Rho GTPases determines T cell function.” *Sci Signal*. 25:1(12):pt3, 2008.

Walsh DA, Bonnet CS, Turner EL, Wilson D, Situ M, McWilliams DF. “Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis.” *Osteoarthritis Cartilage*. 15:743-51, 2000.

Wancket LM, Baragi V, Bove S, Kilgore K, Korytko PJ, Guzman RE. “Anatomical Localization of Cartilage Degradation Markers in a Surgically Induced Rat Osteoarthritis Model.” *Toxicologic Pathology*, 33:484-89 , 2005.

Wang G, Beier F. “Rac1/Cdc42 and RhoA GTPases Antagonistically Regulate Chondrocyte Proliferation, Hypertrophy, and Apoptosis.” *J Bone Miner Res* 20:1022-31, 2005.

Wang G, Woods A, Sabari S, Pagnotta L, Stanton LA, Beier F. “RhoA/ROCK Signaling Suppresses Hypertrophic Chondrocyte Differentiation.” *J. Biol. Chem.*, 279: 13205-14, 2004.

Wennerberg CJ, Der K. “Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it).” *Journal of Cell Science* 117: 1301-12, 2004.

Westacott CI, Barakat AF, Wood L, Perry MJ, Neison P, Bisbinas I, Armstrong L, Millar AB, Elson CJ. “Tumor necrosis factor alpha can contribute to focal loss of cartilage in osteoarthritis.” *Osteoarthritis Cartilage*. 8:213-21, 2000.

Westacott CI, Webb GR, Warnock MG, Sims JV, Elson CJ. "Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone." *Arthritis Rheum.* 40:1282-91, 1997.

White AG, Birnbaum HG, Janagap C, Buteau S, Schein J. "Direct and Indirect Costs of Pain Therapy for Osteoarthritis in an Insured Population in the United States." *J Occup Environ Med.* 50:998-1005, 2008.

Won R, Jung SJ, Park YG, Chung SS, Lee BH. "Crossed-withdrawal reflex in a rat model of neuropathic pain: implications in neural plasticity." *Neurosci Lett.* 369:239-44, 2004.

Woolf AD, Pfleger B. "Burden of major musculoskeletal conditions." *Bull World Health Organ vol.81 no.9 Geneva*, 2003.

Xu H, Liu P, Liang L, Danesh FR, Yang X, Ye Y, Zhan Z, Yu X, Peng H, Sun L. "RhoA-mediated, tumor necrosis factor -induced activation of NF-B in rheumatoid synoviocytes: Inhibitory effect of simvastatin." *Arthritis Rheum* 54: 3441-51, 2006.

Yamamoto T, Takeda K, Harada S, Nakata T, Azuma A, Sasaki S, Nakagawa M. "HMG-CoA reductase inhibitor enhances inducible nitric oxide synthase expression in rat vascular smooth muscle cells; involvement of the Rho/Rho kinase pathway." *Atherosclerosis.* 166:213-22, 2003.

Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K, Motoshima H, Taguchi T, Sonoda K, Kukidome D, Takuwa Y, Kawada T, Brownlee M, Nishikawa T, Araki E. "Statins Activate Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Through Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Cyclooxygenase-2 Expression in Macrophages." *Circulation Research.* 100:1442-51, 2007.

Yaron M, Shirazi I, Yaron I. Anti-interleukin-1 effects of diacerein and rehin in human osteoarthritic synovial tissue and cartilage cultures”. *Osteoarthritis Cartilage*. 7:272–80, 1999.

Yokota K, Miyazaki T, Hirano M, Akiyama Y, Mimura T. “Simvastatin inhibits production of interleukin 6 (IL-6) and IL-8 and cell proliferation induced by tumor necrosis factor-alpha in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis.” *J Rheumatol*. 33:463-71, 2006.

Yokota K, Miyoshi F, Miyazaki T, Sato K, Yoshida Y, Asanuma Y, Akiyama Y, Mimura T. “High concentration simvastatin induces apoptosis in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis.” *J Rheumatol*. 35:193-200, 2008.

Yu LP Jr, Smith GN Jr, Brandt KD, Myers SL, O'Connor BL, Brandt DA. “Reduction of the severity of canine osteoarthritis by prophylactic treatment with oral doxycycline.” *Arthritis Rheum*. 35:1150-9, 1992.

Yuan GH, Tanaka M, Masuko-Hongo K, Shibakawa A, Kato T, Nishioka K, Nakamura H. “Characterization of cells from pannus-like tissue over articular cartilage of advanced osteoarthritis.” *Osteoarthritis Cartilage* 12; 38-45, 2004.

Zhang JM, Jordan Y. “Epidemiology of Osteoarthritis.” *Rheum Dis Clin N Am* 34: 515-29, 2008.

Zhang W, Doherty M, Arden N, Bannwarth B, Bijlsma J, Gunther KP, Hauselmann HJ, Herrero-Beaumont G, Jordan K, Kaklamanis P, Leeb B, Lequesne M, Lohmander S, Mazieres B, Martin-Mola E, Pavelka K, Pendleton A, Punzi L, Swoboda B, Varatojo R, Verbruggen G, Z. “EULAR evidence based recommendations for the management of hip osteoarthritis:

report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT).” *Ann Rheum Dis* 64:669-81, 2005.

Zhang W, Doherty M, Leeb BF, Alekseeva L, Arden NK, Bijlsma JW, Dinger F, Dziedzic K, Häuselmann HJ, Herrero-Beaumont G, Kaklamanis P, Lohmander S, Maheu E, Martín-Mola E, Pavelka K, Punzi L, Reiter S, Sautner J, Smolen J, Verbruggen G, Zimmermann-Górska. “EULAR evidence based recommendations for the management of hand osteoarthritis: Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT).” *Ann Rheum Dis* 66:377-88, 2007.

Zhang W, Li Q, Wang L, Yang X. “Simvastatin ameliorates glomerulosclerosis in Adriamycin-induced-nephropathy rats.” *Pediatr Nephrol.* 23:2185-94, 2008.

Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, Bierma-Zeinstra S, Brandt KD, Croft P, Doherty M, Dougados M, Hochberg M, Hunter DJ, Kwoh K, Lohmander LS, Tugwell P. “OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines.” *Osteoarthritis Cartilage* 16: 137-62, 2008.

Zhang X, Jin J, Peng X, Ramgolam VS, Markovic-Plese S. “Simvastatin inhibits IL-17 secretion by targeting multiple IL-17-regulatory cytokines and by inhibiting the expression of IL-17 transcription factor RORC in CD4+ lymphocytes.” *J Immunol.* 180:6988-96, 2008.

Zhang X, Mao Z, Yu C. “Suppression of early experimental osteoarthritis by gene transfer of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10.” *J Orthop Res* 22: 742 - 50, 2004.

Zhang Y, Hannan MT, Chaisson CE, McAlindon TE, Evans SR, Aliabadi P, Levy D, Felson DT. “Bone mineral density and risk of incident and progressive radiographic knee osteoarthritis in women: the Framingham Study.” *J Rheumatol.* 27:1032-7, 2000.

Zhou HW, Lou SQ, Zhang K. "Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by p16INK4a-specific siRNA in vitro." *Rheumatology* 43: 555-68, 2004.

Zhu H-J, Burgess AW. "Regulation of Transforming Growth Factor- β Signaling." *Mol Cell Biol Res Comm* 4:321-30, 2001.

ANEXOS

Escore OARSI

OA cartilage histopathology grade assessment—advanced grading methodology

Grade (key feature)	Subgrade (optional)	Associated criteria (tissue reaction)
Grade 0: surface intact, cartilage intact	No subgrade	Intact, uninvolved cartilage
Grade 1: surface intact	1.0 Cells intact 1.5 Cell death	Matrix: superficial zone intact, edema and/or fibrillation Cells: proliferation (clusters), hypertrophy Reaction must be more than superficial fibrillation only
Grade 2: surface discontinuity	2.0 Fibrillation through superficial zone 2.5 Surface abrasion with matrix loss within superficial zone	As above +Discontinuity at superficial zone ±Cationic stain matrix depletion (Safranin O or Toluidine Blue) upper 1/3 of cartilage (mid zone) ±Disorientation of chondron columns
Grade 3: vertical fissures	3.0 Simple fissures 3.5 Branched/complex fissures	As above ±Cationic stain depletion (Safranin O or Toluidine Blue) into lower 2/3 of cartilage (deep zone) ±New collagen formation (polarized light microscopy, Picro Sirius Red stain)
Grade 4: erosion	4.0 Superficial zone delamination 4.5 Mid zone excavation	Cartilage matrix loss, cyst formation within cartilage matrix
Grade 5: denudation	5.0 Bone surface intact 5.5 Reparative tissue surface present	Surface is sclerotic bone or reparative tissue including fibrocartilage
Grade 6: deformation	6.0 Joint margin osteophytes 6.5 Joint margin and central osteophytes	Bone remodelling. Deformation of articular surface contour (more than osteophyte formation only) Includes: microfracture and repair

I. Grade = depth progression into cartilage.

OA cartilage histopathology—stage assessment

Stage	% Involvement (surface, area, volume)
Stage 0	No OA activity seen
Stage 1	< 10%
Stage 2	10–25%
Stage 3	25–50%
Stage 4	> 50%

Stage = extent of joint involvement.

(Pritzker et al., 2006)